



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación de indicadores de deterioro de miel de diferentes especies de abejas

Ana Ruby Correa Mosquera

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Bogotá, Colombia

2015

Evaluación de indicadores de deterioro de miel de diferentes especies de abejas

Ana Ruby Correa Mosquera

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Directora:

Ing. Marta Cecilia Quicazán MSc. PhD.

Línea de Investigación:

Caracterización y generación de valor de productos apícolas

Grupo de Investigación:

Aseguramiento de la calidad de alimentos y desarrollo de nuevos productos

Proyectos:

“Identificación de marcadores para miel de abejas originaria de cultivos de café orgánico en la Sierra Nevada de Santa Marta” y “Reconocimiento de las características bioactivas de mieles de abejas nativas de Colombia y desarrollo de tecnologías para su conservación y empaque”

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Bogotá, Colombia

2015

A la memoria de mi padre Luis Enrique Correa, que a pesar que la vida no le alcanzó, sus sueños continuaron conmigo y hoy son realidad.

A mi madre Emerita Mosquera, por ser una mujer luchadora de gran corazón que siempre encuentra la luz en medio de las tormentas. Por ser tan incondicional, por acompañarme a llorar, a reír, a soñar y por darme alas para volar lejos de casa con la certeza que el camino de regreso nunca voy a olvidar.

A mis hermanos Henry Mosquera, Mary Cometa, Lilia Pipicano, Janeth Correa, Milton Correa y Paola Correa, por hacer de mis sueños los suyos e hinchar sus corazones de orgullo al verme triunfar.

“Mucho mejor atreverse a hacer cosas grandes, a obtener triunfos gloriosos, aun cuando matizados con fracasos, que formar en las filas de aquellos pobres de espíritu que ni gozan mucho ni sufren mucho porque viven en el crepúsculo gris que no conoce la victoria ni la derrota”

Theodore Roosevelt

Agradecimientos

Esta tesis es el resultado del trabajo en equipo de muchas personas y del asocio del sector productivo con la academia. Por lo tanto, la autora expresa sus más sinceros agradecimientos a las siguientes personas y entidades:

A mi directora de tesis, la Dra. Marta Cecilia Quicazán por sus oportunas palabras en los momentos difíciles, por hacer de la investigación científica un estilo de vida, por cambiar mi vida con su confianza y con todas las oportunidades que recibí y por ser la primera persona en llevarme a conocer otros países.

A la Ing. Claudia Hernández por creer siempre en mí y traerme consigo a la Universidad Nacional de Colombia, por compartir conmigo todas las oportunidades de vida y por ser mi referente de personal y profesional. Por toda su ayuda científica, técnica y personal.

Al Ing. Andrés Durán por su ayuda desde mi primer día en la Universidad, por todos los cafés compartidos, por las horas de tertulias, risas y por las mejores clases de historia e inglés. Por ser el amigo que todas las personas deberíamos tener. Al Ing. Carlos Zuluaga por compartir sus valiosos conocimientos de análisis estadísticos, a la Ing. Andrea Nieto y Angélica Benavides, por su valiosa amistad y colaboración, a mis compañeritas Edith Castro y Adriana Zamudio por su gran amistad, por levantarme cuando perdí la esperanza. A todos mis compañeritos de oficina y laboratorio y a los estudiantes de Ing. Química y Bacteriología que realizaron sus prácticas en ICTA y colaboraron con la experimentación de mi tesis. A todos mil gracias.

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – COLCIENCIAS, por la financiación de los proyectos en los que se desarrolló esta tesis y por la beca de Jóvenes Investigadores año 2012 que me permitió iniciar mis estudios de posgrado. Al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA y a todo el personal que allí labora por toda la colaboración técnica y científica en el desarrollo de esta tesis. A la red Colsierra, Apisierra y al señor Éibar Castillo del Jardín Botánico de Medellín por proporcionar las muestras de miel con las que se elaboró esta investigación.

Resumen

Las abejas juegan un papel preponderante en la seguridad alimentaria debido a su acción polinizadora que asegura la producción de semillas. Además de *Apis mellifera*, en Colombia existen especies de abejas sin aguijón, dentro de las cuales se destaca *Tetragonisca angustula* por su adaptabilidad y capacidad de almacenar miel, producto que puede ser aprovechado como recurso económico adicional para el campesino. Sin embargo, su humedad favorece el deterioro, afecta su inocuidad y limita su comercialización como alimento con estándares adecuados de calidad. En este trabajo se evaluaron la pasteurización y la tindalización como alternativas de conservación y se efectuaron pruebas de almacenamiento bajo condiciones acelerantes de degradación de la miel de las dos especies (a 30, 40 y 50 °C); se efectuó monitoreo de las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales y se seleccionaron aquellas más relevantes. Se encontró que las variables acidez, HMF y color tuvieron mayor importancia durante el almacenamiento de miel de *A. mellifera*, mientras que acidez, HMF, color y diastasa predominaron en la miel de *T. angustula*. En cada caso se hallaron los modelos cinéticos para describir la pérdida de la calidad y mediante la ecuación de Arrhenius se demostró que los dos tipos de miel difieren apreciablemente en las energías de activación para el deterioro de cada una de las propiedades, con valores siempre mayores para *T. angustula*, lo cual explica su mayor termoestabilidad, aspecto que, a diferencia de la miel de *A. mellifera*, permite la aplicación de tratamientos térmicos como método de conservación.

Palabras clave: *Apis mellifera*, pasteurización, *Tetragonisca angustula*, tindalización, vida útil.

Abstract

Bees play an important role in food security due to its pollination action that ensures the production of seeds. Besides *Apis mellifera*, there are many stingless bee species in Colombia, among which stands out *Tetragonisca angustula* for its adaptability and ability to store honey, product that can be exploited as an additional economic resource for farmers. However, this honey is higher in moisture that promotes its quality deterioration and affects the market possibilities. In this work, pasteurization and tyndalization were evaluated as preservation alternatives for honey, and storage tests were conducted under conditions for accelerating degradation of honey of the two species (at 30, 40 and 50 °C) for monitoring of physico-chemical, microbiological and sensory properties; the most relevant were selected. It was found that acidity, HMF and color were more important during storage of *A. mellifera* honey, while acidity, HMF, color and diastasa dominated for *T. angustula* honey. In each case the kinetic models were found to describe the loss of quality and by the Arrhenius equation, it was showed that the two types of honey differ appreciably in the activation energies for the deterioration of each of the properties, always with higher values for *T. angustula* honey; unlike *A. mellifera* honey, this fact explains its higher thermal stability and allows the application of heat treatment as method of conservation.

Keywords: *Apis mellifera*, *Tetragonisca angustula*, pasteurization, tyndalization, shelf life.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	VIII
Lista de Figuras.....	14
Lista de Tablas.....	15
Lista de símbolos y abreviaturas.....	18
Introducción.....	21
1 Objetivos.....	26
1.1 Objetivo general.....	26
1.2 Objetivos específicos.....	26
2 Revisión bibliográfica.....	27
2.1 Apicultura.....	27
2.1.1 Miel de abeja.....	28
2.1.2 Composición de la miel de <i>A. mellifera</i>	28
2.1.3 Propiedades de la miel de <i>A. mellifera</i>	33
2.1.4 Parámetros de calidad de la miel de abejas.....	36
2.1.5 Producción de miel en Colombia.....	41
2.1.6 Normatividad para miel de <i>A. mellifera</i>	42
2.2 Meliponicultura.....	44
2.2.1 Abejas sin aguijón.....	45
2.2.2 Proceso de cosecha de la miel de abejas sin aguijón.....	52
2.2.3 Potencial productivo de la miel de abejas sin aguijón en Colombia.....	55
2.2.4 Composición de la miel de abejas sin aguijón.....	56
2.2.5 Normatividad para miel de abejas sin aguijón.....	57
2.2.6 Mercado de la miel de abejas sin aguijón en Colombia.....	57
2.3 Mecanismos de deterioro en los alimentos.....	58
2.3.1 Transferencia de humedad y/o vapor de agua.....	58
2.3.2 Transferencia física de sustancias diferentes a la humedad y/o vapor de agua.....	58
2.3.3 Cambios químicos y/o bioquímicos.....	59
2.3.4 Cambios inducidos por la luz.....	61
2.3.5 Cambios microbiológicos.....	61
2.4 Procesos de conservación aplicados en alimentos.....	62
2.4.1 Tratamientos térmicos.....	62
2.4.2 Conservantes.....	64
2.5 Procesos de conservación aplicados a miel de abejas.....	64
2.5.1 Calentamiento.....	64
2.5.2 Pasterización.....	65
2.5.3 Tindalización.....	66
2.5.4 Maduración.....	67
2.5.5 Deshumidificación.....	67
2.5.6 Ultrasonido.....	67
2.5.7 Altas presiones hidrostáticas.....	68
2.6 Vida útil de los alimentos.....	68
2.6.1 Factores que influyen en la vida útil de los alimentos.....	69
2.6.2 Determinación de la vida útil de los alimentos.....	70

2.6.3	Modelamiento de las variables de respuesta de los estudios de vida útil...	73
2.7	Antecedentes.....	77
2.7.1	Efecto de los tratamientos térmicos sobre los parámetro de calidad de la miel de abejas de <i>A. mellifera</i>	77
2.7.2	Efecto del almacenamiento sobre los parámetros de calidad de la miel de abejas de <i>A. mellifera</i>	80
2.7.3	Estudios de calidad en miel de abejas sin aguijón (meliponini).....	82
2.7.4	Efecto de los tratamientos térmicos sobre la calidad e miel de abejas sin aguijón.....	84
2.7.5	Calidad de la miel de abejas sin aguijón durante el almacenamiento.....	84
3	Materiales y métodos	86
3.1	Selección de la especie de abejas sin aguijón productora de miel en Colombia.....	86
3.2	Caracterización de miel de abejas de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	87
3.2.1	Análisis fisicoquímicos realizados a miel de abejas de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	87
3.2.2	Análisis microbiológicos realizados a miel de abejas de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	87
3.3	Evaluación del efecto de tratamientos térmicos sobre la calidad de la miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	88
3.4	Monitoreo del almacenamiento en condiciones acelerantes de miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i> tindalizada a 80 °C por 15 min	89
3.5	Análisis cinético de las variables de calidad fisicoquímicas en la miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i> durante el almacenamiento.....	90
3.6	Predicción de la vida útil de miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	91
4	Resultados y discusión	92
4.1	Selección de la especie de abejas sin aguijón productora de miel.....	92
4.2	Caracterización de miel de abejas de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	92
4.3	Efecto de tratamientos térmicos sobre la calidad microbiológica de miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	95
4.4	Efecto de tratamientos térmicos sobre los parámetros fisicoquímicos de miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	97
4.4.1	Parámetros fisicoquímicos de miel de <i>A. mellifera</i> tratada térmicamente...	97
4.4.2	Parámetros fisicoquímicos de miel de <i>T. angustula</i> tratada térmicamente..	99
4.5	Evaluación miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i> tindalizadaa 80 °C por 15 min durante el almacenamiento en condiciones de temperatura acelerantes.....	100
4.5.1	Efecto del almacenamiento en condiciones de temperatura acelerantes sobre la calidad microbiológicos de miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	100
4.5.2	Efecto del almacenamiento en condiciones de temperatura acelerantes sobre los parámetros fisicoquímicos de miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	105
4.6	Comparaciones del comportamiento de deterioro de miel de abejas de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	109
4.6.1	Efectos de los tratamientos térmicos sobre la calidad microbiológica de miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	109
4.6.2	Efecto de los tratamientos térmicos sobre la calidad fisicoquímica de miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	111
4.6.3	Efecto del almacenamiento en condiciones de temperatura acelerantes sobre la calidad de la miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	112

4.7	Análisis estadístico con métodos no supervisados de las variables de calidad de miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i> durante el almacenamiento acelerado.....	115
4.8	Predicción de la vida útil de miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	121
5	Conclusiones y recomendaciones	124
5.1	Conclusiones.....	124
5.2	Recomendaciones.....	126
	Bibliografía.....	128

Lista de Figuras

	Pág
Figura 2-1: Formación de HMF a partir de glucosa y fructosa en medio ácido.....	38
Figura 2-2: Adecuación del espacio para realizar la extracción de la miel de abejas sin aguijón.....	53
Figura 2-3: Instalación dentro del toldillo de los utensilios con los que se realizara la extracción de la miel de abejas sin aguijón.....	54
Figura 2-4: Indumentaria del personal que realizara la extracción de la miel de abejas sin aguijón.....	54
Figura 2-5: Representación grafica del comportamiento de los datos de la variable de calidad acuerdo al orden de reacción cinética.....	75
Figura 4-1: Análisis de componentes principales de la caracterización del perfil aromático por nariz electrónica de las muestras de miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	96
Figura 4-2: Efecto del almacenamiento acelerado a 30, 40 y 50 °C en el perfil aromático de miel <i>T. angustula</i> y <i>A. mellifera</i>	116
Figura 4-3: Representación grafica del cálculo de la energía de activación de los parámetros fisicoquímicos de la miel de <i>T. angustula</i>	120
Figura 4-4: Representación grafica del cálculo de la energía de activación de los parámetros fisicoquímicos de la miel de <i>T. angustula</i>	121
Figura 4-5: Vida útil de miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i> de acuerdo a la cinética de formación de HMF en función de la temperatura de almacenamiento.....	122
Figura 4-6: Vida útil de miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i> de acuerdo a la cinética de comportamiento de la acidez libre en función de la temperatura de almacenamiento.....	123

Lista de Tablas

	Pág
Tabla 2-1: Comparación de la composición de la miel de <i>A. mellifera</i>	29
Tabla 2-2: Requisitos fisicoquímicos de la miel de abejas de <i>A. mellifera</i>	44
Tabla 2-3: Requisitos microbiológicos de la miel de abejas de <i>A. mellifera</i> ...	44
Tabla 2-4: Lista actual de las principales especies, nombres comunes y distribución de las abejas sin aguijón utilizadas en meliponicultura en Colombia.Nomenclatura y distribución original.....	47
Tabla 2-5: Número estimado de especies de abejas sin aguijón y número de especies cultivadas en Colombia y otros países en los que se desarrolla la meliponicultura.....	49
Tabla 2-6: Precios de miel de acuerdo a la especie y ubicación de producción en Brasil.....	50
Tabla 2-7: País de origen y la producción de miel estimada por las abejas sin aguijón.....	51
Tabla 2-8: Comparación de la composición química de miel de diferentes especies de abejas sin aguijón de Colombia contra la composición química miel de <i>A. mellifera</i> procedente de la Sierra Nevada de Santa Marta y un estándar internacional.....	56
Tabla 2-9: Estándares normativos sugeridos para el control de calidad de la miel de Meliponinos y <i>T. angustula</i> en Brasil.....	57
Tabla 3-1: Frecuencias de muestreo de miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i> tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenada en condiciones de temperatura acelerantes de 30, 40 y 50 °C.....	89
Tabla 4-1: Caracterización microbiológica de miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	93
Tabla 4-2: Caracterización fisicoquímica de miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	93
Tabla 4-3: Resultados de análisis microbiológicos de miel de <i>A. mellifera</i> tratada térmicamente.....	95

Tabla 4-4:	Análisis Microbiológico para miel de <i>T. angustula</i> tratada térmicamente.....	96
Tabla 4-5:	Análisis Fisicoquímico para miel de <i>A. mellifera</i> tratada térmicamente.....	98
Tabla 4-6:	Análisis Fisicoquímico para miel de <i>T. angustula</i> tratada térmicamente.....	99
Tabla 4-7:	Características microbiológicas de miel de <i>A. mellifera</i> colectada en la Sierra Nevada de Santa Marta, tindalizada a 80 °C por 15 minutos y almacenada a 30 °C.....	101
Tabla 4-8:	Caráctericas microbiológicas de miel de <i>A. mellifera</i> colectada en la Sierra Nevada de Santa Marta, tindalizada a 80 °C por 15 minutos y almacenada a 40 °C.....	102
Tabla 4-9:	Parámetros microbiológicos de miel de <i>A. mellifera</i> colectada en la Sierra Nevada de Santa Marta, tindalizada a 80 °C por 15 minutos y almacenada a 50 °C.....	102
Tabla 4-10:	Parámetros microbiológicos de miel de <i>T. angustula</i> colectada en el Jardín Botánico de Medellín, tindalizada a 80 °C por 15 minutos y almacenada a 30 °C.....	102
Tabla 4-11:	Caráctericas microbiológicas de miel de <i>T. angustula</i> colectada en el Jardín Botánico de Medellín, tindalizada a 80 °C por 15 minutos y almacenada a 40 °C.....	103
Tabla 4-12:	Caráctericas microbiológicos de miel de <i>T. angustula</i> colectada en el Jardín Botánico de Medellín, tindalizada a 80 °C por 15 minutos y almacenada a 50 °C.....	103
Tabla 4-13:	Caráctericas fisicoquímicos de miel de <i>A. mellifera</i> tindalizada a 80 °C por 15 minutos y almacenada a 30 °C.....	105
Tabla 4-14:	Caráctericas fisicoquímicos de miel de <i>A. mellifera</i> , tindalizada a 80 °C por 15 minutos y almacenada a 40 °C.....	105
Tabla 4-15:	Caráctericas fisicoquímicos de miel de <i>A. mellifera</i> , tindalizada a 80 °C por 15 minutos y almacenada a 50 °C.....	106
Tabla 4-16:	Caráctericas fisicoquímicos de miel de <i>T. angustula</i> colectada en el Jardín Botánico de Medellín, tindalizada a 80 °C por 15 minutos y almacenada a 30 °C.....	108
Tabla 4-17:	Caráctericas fisicoquímicos de miel de <i>T. angustula</i> colectada en el Jardín Botánico de Medellín, tindalizada a 80 °C por 15 minutos y almacenada a 40 °C.....	108

Tabla 4-18:	Características fisicoquímicos de miel de <i>T. angustula</i> colectada en el Jardín Botánico de Medellín, tinalizada a 80 °C por 15 minutos y almacenada a 50 °C.....	108
Tabla 4-19:	Coefficientes de correlación de las variables fisicoquímicas de la miel de <i>A. mellifera</i> almacenada a 30, 40 y 50 °C según el orden de reacción de modelos cinéticos	116
Tabla 4-20:	Coefficientes de correlación de las variables fisicoquímicas de la miel de <i>T. angustula</i> almacenada a 30, 40 y 50 °C según el orden de reacción de modelos cinéticos.....	117
Tabla 4-21:	Parámetros consolidados de los modelos cinéticos para la miel de <i>T. angustula</i> y <i>A. mellifera</i> a diferentes temperaturas	160
Tabla 4-22:	Parámetros consolidados de los modelos cinéticos para la miel de <i>T. angustula</i> y <i>A. mellifera</i> a diferentes temperaturas.....	161
Tabla 4-23:	Parámetros de la ecuación de Arrhenius de las características fisicoquímica modeladas de la miel de <i>A. mellifera</i> y <i>T. angustula</i>	163

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término
Aw	Actividad de agua
b	Velocidad máxima de crecimiento
cm	Centímetros
D _T	Reducción decimal
E(t)	Valor de vida útil esperado
Ea	Energía de activación
f(t)	Función de probabilidad
g	Gramo
h	Hora
h(t)	Valores de riesgo
k	Constante de velocidad de deterioro
K	Observaciones
kg	Kilogramo
kHz	KiloHerz
L	Litros
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
Mpa	Megapascuales
mS	Milisiemens
n	Número de muestras
N	Población de microorganismos
N ₀	Población de microorganismos inicial
°C	Grados centígrados
ppm	Partes por millón mg/kg
Q	Parámetro de calidad
Q ₀	Valor inicial del parámetro
R	Constante universal de los gases
s	Segundos
Sen	Seno

t	Tiempo
T	Temperatura
T _{min}	Temperatura de mínimo crecimiento
W	Watts
W1C	Compuestos aromáticos
W1S	Metano
W1W	Terpenos y compuestos orgánicos azufrados
W2S	Alcoholes
W2W	Compuestos azufrados
W3C	Compuestos aromáticos
W3S	Metano y compuestos alifáticos
W5C	Alcanos
W5S	Compuestos de óxido nitroso y ozono
W6S	Compuestos de respiración, H ₂ , O ₂ y CO ₂
z	Dependencia de la temperatura

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
α	Parámetro de escala		
β	Parámetro de forma		
λ	Longitud de onda		
Γ	Función gamma		
μ	micro		

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ABTS	Allied Biztech Solutions
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AOAC	Association of Official Agricultural Chemist
ANOVA	Análisis de Varianza
ANT	Antioquia
ATL	Atlántico
BOY	Boyacá
BP	British Pharmacopeial
BPM	Buenas prácticas de Manufactura
CAL	Caldas
CAU	Cauca
CES	Cesar
COLCIENCIAS	Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
COVENIN	Comisión Venezolana de Normas Industriales
CUN	Cundinamarca

Abreviatura	Término
DGNTI	Dirección General de Normas y Tecnología Industrial
DS	Desviación Estándar
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FRAP	Ferric ion reducing antioxidant power
GMS	Grupo Mercado Común
HMF	Hidroximetilfurfural
HPP	High Pressure Processing
HR	Humedad Relativa
IBCE	Instituto Boliviano de Comercio Exterior
ICONTEC	Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación
ICTA	Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos
IHC	International Honey Commission
IMNC	Instituto Mexicano de Normalización y Certificación
INBORCA	Instituto Boliviano de Normalización y Calidad
INN	Instituto Nacional de Normalización - Chile
ISO	International Organization for Standardization
MAG-MEIC	Ministerio de Agricultura y Ganadería - Ministerio de Economía, Industria y Comercio
MOS	Oxido metálicos
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NB	Normas de Bolivia
NCh	Norma Chilena
ND	No Detectable, sin información
NF	National Formulary
NMX	Norma Mexicana
NTC	Norma Técnica Colombiana
PCA	Análisis de Componentes Principales
PET	Tereftalato de polietileno
pH	Potencial de hidrógeno
PUT	Putumayo
RTCR	Reglamento Técnico de Costa Rica
SAN	Santander
SUC	Sucre
ssp.	Todas las especies del género
TOL	Tolima
TSA	Trypticase soy agar
U.S	United State
USD	United State Dollare
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
USDA	U.S. Department of Agriculture
USP	U.S. Pharmacopeial Convention
UV	Ultravioleta
VAL	Valle
VAU	Vaupés

Introducción

La obtención de productos de las abejas, como resultado del cuidado que el hombre ejerce sobre ellas, constituye una práctica que contribuye a la seguridad alimentaria de un país, debido a que el rendimiento de muchos cultivos depende de la polinización cruzada que promueven estos insectos. El interés productivo prestado a las abejas permite mejorar el ingreso a nivel rural, de una manera amable con el medio ambiente, pues se puede practicar simultáneamente con otras labores del campo. De las colmenas se pueden aprovechar productos de valor en el orden alimenticio (miel y polen), especialmente por acción protectora a la salud que concuerda con la actual tendencia de alimentos funcionales (Ulloa *et al.*, 2010); farmacéutico (propóleos, apitoxina, jalea real) por estudios que muestran su actividad terapéutica; o industrial (cera), por las aplicaciones específicas en determinados procesos (Vit *et al.*, 2006a y Laverde *et al.*, 2010).

La polinización es un servicio ecológico decisivo en el mantenimiento y conservación de los ecosistemas. La disponibilidad de una buena parte de semillas, frutos y en general de alimentos para una comunidad o una nación, sería imposible sin la acción de estos insectos (Pimentel *et al.*, 1997). Por otra parte, la susceptibilidad de las abejas a agentes contaminantes de medio ambiente y al cambio climático, evidenciada por el síndrome de desaparición de las abejas y la aparición de nuevas enfermedades, ha promovido su utilización como biomarcadores del estado de sanidad del entorno (Ballivián, 2008 y Silva & Paz, 2012).

Se cree que existen aproximadamente 6000 especies de abejas en el mundo, con una amplia distribución geográfica en las áreas tropicales y subtropicales; las abejas pueden tener o no aguijón. La especie con aguijón comúnmente conocida, primordialmente por el gran avance en su manejo hacia la producción de miel, corresponde a *Apis mellifera*. Las abejas sin aguijón presentan colonias pobladas y perennes; exploran un amplio espectro de flora a lo largo del año, razón por la que son consideradas especies generalistas

(Feversani, 2011 y Michener, 1979). Se estima que en países como Brasil, las abejas nativas sin aguijón son las principales responsables de la polinización de muchas especies autóctonas de árboles (Kerr, 1997). En Colombia, además de *A. mellifera*, podrían encontrarse aproximadamente 1000 especies sin aguijón, considerando la riqueza de recursos florales existentes y la diversidad de ecosistemas propios del país (Nates-Parra, 2001). Antes del descubrimiento de América, las abejas nativas sin aguijón eran empleadas para producción de miel, como principal fuente de azúcares. Adicionalmente, con base en el auge que tuvo la orfebrería en la zona central de Colombia, se presume la existencia de una organización productiva para la cera como insumo indispensable en la técnica de “fundición a la cera perdida” (Vit, 1999, Toriz & Roman, 2005 y Jones, 2013). La colonización de Centro y Sur América por parte de Europa minimizó la crianza de abejas sin aguijón y en Colombia prácticamente se anuló, pues prevaleció *A. mellifera* para la producción de miel (Crane, 1992, Rosso & Nates-Parra, 2005 y Rodríguez, 2007).

La producción anual mundial de miel de *A. mellifera*, según la FAO, ha estado alrededor de 1,3 millones de toneladas, con una tendencia de crecimiento anual del orden del 2%, reportada hasta 2010. China ha llegado a ser el país con mayor producción apícola en el mundo; cuenta con aproximadamente 7 millones de colonias de abejas domésticas. En el 2007, el 50% de la producción mundial se concentró en siete países: China con 303.220 toneladas (22%), Argentina con 81.000 toneladas (6%), Turquía con 73.935 toneladas (5%). También se destacan otros países como Ucrania, Estados Unidos, México y Rusia, con producciones de 67.700, 67.286, 55.459 y 55.173 toneladas, respectivamente. Además de Argentina, en Latinoamérica sobresalen México, en el sexto puesto y Brasil en el undécimo; Colombia se ha reportado en el puesto 70. En los últimos 5 años, los precios de los productos apícolas, en especial, de las mieles de abejas han mostrado una tendencia hacia el incremento, debido a la caída en la producción mundial por razones como el síndrome de desaparición (Vit *et al.*, 2006b y Laverde *et al.*, 2010)

La cadena productiva de la apicultura y las abejas se ha desarrollado muy lentamente en Colombia, lo cual se refleja en el hecho de que solamente hasta el año 2012 fue reconocida oficialmente por parte del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Después del trauma de la apicultura a causa de la africanización, en este país la cadena se encuentra en período de recuperación; la oferta de miel no alcanza a cubrir la

demanda nacional, lo cual ha incrementado la práctica desleal de la falsificación y la adulteración. A partir del reconocimiento oficial de esta cadena, se han promovido vínculos entre la academia y el sector productivo para la investigación y el desarrollo tecnológico. Se han integrado productores a través de asociaciones o cooperativas de apicultores, con la Universidad Nacional de Colombia mediante proyectos que cuentan con el aporte de recursos financieros de entidades como Colciencias y el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

La miel de abejas de *A. mellifera*, por ser la más conocida y para la cual existen procedimientos tecnológicos de producción, extracción y envasado, ha sido muy estudiada y en la actualidad muchos países, incluyendo a Colombia, cuentan con reglamentos y normas técnicas para el control de calidad a través de métodos armonizados basados en los documentos liderados por la International Honey Commission (Bogdanov, 2002). Por consiguiente su comercialización se lleva a cabo de una manera rutinaria y existen procedimientos para efectuar transacciones comerciales formales a nivel internacional. Por lo contrario, para la miel de abejas sin aguijón no hay avances sobresalientes, a pesar de que se han reportado algunos estudios de diferentes países sobre caracterización química y microbiológica (Vit *et al.*, 2013). En todos los casos se destaca que para estas mieles el contenido de humedad mayor al 20%, aspecto que favorece la proliferación de microorganismos y su consiguiente deterioro, que implica la necesidad de aplicar algún tratamiento para su estabilización o conservación. A pesar de esta limitación, en diferentes regiones colombianas y en otros países latinoamericanos, se lleva a cabo a pequeña escala, la comercialización en mercados informales o en tiendas naturistas de estas mieles, a las cuales se le atribuyen propiedades curativas para algunas dolencias, razón por la cual su precio en el mercado puede ser de 5 a 100 veces superior a la miel de *A. mellifera* (Ramos-Elorduy *et al.*, 2009 y IBCE, 2010).

Considerando la necesidad de avanzar en el conocimiento de estas mieles, en Colombia, el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional de Colombia, con el soporte financiero del departamento Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS) tiene en marcha el proyecto "Reconocimiento de las características bioactivas de mieles de abejas nativas de Colombia y desarrollo de tecnologías para su conservación y empaque", el cual se enfoca en establecer técnicas

de extracción, procesamiento y almacenamiento, que permitan prolongar la vida útil y crear valor agregado en mieles de abejas nativas colombianas. Como premisa indispensable se considera la miel vista como alimento, para lo cual es indispensable enfocarse en criterios claros de calidad para consumo humano. Es preciso mencionar que la norma ISO 9000: 2005, define calidad como el conjunto de propiedades y características que ofrece un producto o servicio para satisfacer las necesidades declaradas o implícitas del consumidor. De acuerdo al tipo de mercado objetivo, se pueden definir diferentes grados de calidad: grado comercial, grado calidad alimentaria y grado farmacéutico. El grado comercial de materias primas o de productos terminados tiene que ver con su aplicabilidad industrial o doméstica, pero no implica posibilidades de uso para ingestión humana. Por otro lado, la categoría o grado alimenticio es asignada con base en la inocuidad, a productos terminados, materias primas o aditivos que no contienen compuestos contaminantes que afecten la salud humana y por lo tanto, pueden ser utilizados en la industria de alimentos. Mientras que los productos que poseen una categoría o grado farmacéutico, corresponden a medicamentos, productos biológicos o reactivos, que han cumplido con las normas establecidas por la entidades como USP (U.S. Pharmacopeial Convention), NF (National Formulary of USA) o BP (British Pharmacopeial) y además han obtenido la aprobación para la venta o distribución por la FDA (Food and Drug Administration).

Dentro de este contexto se llevó a cabo esta tesis con el fin de aportar en el conocimiento del comportamiento de los indicadores de deterioro durante el almacenamiento de miel de abejas sin aguijón respecto a la miel de *A. mellifera* procedente de la zona cafetera de la Sierra Nevada de Santa Marta y en la búsqueda de tratamientos térmicos adecuados para dar estabilidad a la miel de abejas nativas y predecir su vida útil. Con base en la búsqueda realizada, se seleccionó la miel de la especie *T. angustula*, debido a su relativa abundancia y a las posibilidades de expansión en su producción en el país; para disponer de cantidades suficientes de miel para efectuar las pruebas, la miel se tomó de los meliponarios ubicados en el Jardín botánico de Medellín “Joaquín Antonio Uribe”. Para la miel de las dos especies de abejas, se realizó inicialmente una caracterización fisicoquímica, microbiológica y se establecieron las bases para la evaluación sensorial. Se logró corroborar que existen grandes diferencias entre los dos tipos de miel en cuanto parámetro fisicoquímico y sensorial. Adicionalmente, mientras que para la miel de *A. mellifera* no se encontraron problemas microbiológicos, para la

miel de *T. angustula* se encontraron recuentos microbiológicos inaceptables de microorganismos patógenos como *Clostridium* spp. Se probó la pasteurización de la miel del Jardín botánico “Joaquín Antonio Uribe” de la Ciudad de Medellín y se acudió a la aplicación de un método no convencional como es la tindalización como alternativa de conservación de la miel de abejas sin aguijón. Los resultados mostraron que la miel de *A. mellifera* es más susceptible de deterioro ante tratamiento térmicos respecto a la miel de *T. angustula*. En esta miel se pudieron comprobar los beneficios de la tindalización en cuanto a la reducción de esporas de microorganismos sulfitos reductores como alternativa de estabilización microbiológica.

Mediante el seguimiento de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas durante el almacenamiento a 30, 40 y 50 °C, para inducir un deterioro acelerado de los dos tipos de miel previamente tindalizadas, fue posible establecer modelos cinéticos de la pérdida de calidad y utilizando el modelo de Arrhenius se efectuó una extrapolación a las temperaturas reales de almacenamiento para los dos tipos de miel con el fin de predecir su tiempo de vida útil. Los modelos obtenidos permitirán establecer las bases para un adecuado control de la miel de abejas de *T. angustula* y de *A. mellifera* en las diferentes etapas de la cadena de distribución.

Este trabajo permitió evidenciar que la calidad de la miel de abejas sin aguijón depende fundamentalmente de las condiciones bajo las cuales se produce y se extrae; por lo tanto es indispensable disponer de diseños de colmenas tecnificadas, enfocadas en la producción higiénica y eficiente de la miel. Adicionalmente se demostró que, a diferencia de la miel de *A. mellifera*, se requiere un tratamiento térmico para conferirle estabilidad a estas mieles, en este caso de *T. angustula* y que es posible predecir su tiempo de vida útil según las condiciones de almacenamiento. Con este estudio se establecen las bases para efectuar actividades de transferencia a los productores de miel de abejas sin aguijón, para mejorar la calidad y las posibilidades de comercialización segura, de manera que simultáneamente se contribuya a la economía de familias rurales y a la conservación de estas especies de abejas que, a pesar de su importante papel en la polinización y en la conservación de especies vegetales propias, se encuentran en peligro de extinción.

1 Objetivos

1.1 Objetivo general

Valorar el comportamiento de los indicadores de deterioro durante el almacenamiento de miel de abejas de diferentes especies.

1.2 Objetivos específicos

- Seleccionar dos especies de abejas para realizar estudio de acuerdo a criterios de productividad, pertinencia economía y ecológica.
- Evaluar el comportamiento durante el almacenamiento de las mieles de abeja tratadas térmicamente en cuanto a propiedades fisicoquímica y calidad microbiológica.
- Efectuar comparaciones del comportamiento de deterioro de mieles de abejas de diferentes especies.
- Describir los cambios de calidad fisicoquímica y microbiológica de la miel de abejas de las dos especies, mediante modelos matemáticos de predicción de vida útil.

2 Revisión Bibliográfica

Las abejas pertenecen al Reino Animalia, a la Clase Insecta, al Orden Hymenoptera y a la Familia Apidae. Y esta consta de dos Subfamilias: Bombinae y Apinae. La Bombinae presenta dos Tribus: *Euglosini* (abejas de las Orquídeas) y *Bombini* (los abejorros); la Apinae se subdivide en las tribus *Meliponini* (abejas sin aguijón) y Apini (las abejas melíferas) (Michener, 2007).

La tribu Apini presenta un solo Género: *Apis*, en el cual existen cuatro Especies: la abeja melífera gigante *Apis dorsata*, la abeja melífera enana *Apis florea*, la abeja melífera oriental *Apis cerana* y la abeja melífera occidental *Apis mellifera*. Esta última; originaria de Europa, África y Asia Suroccidental, debido a los diferentes factores ambientales existentes en cada región, desarrollaron grupos de individuos que aunque perteneciendo a una misma especie se adaptaron a un medio particular; originando otro grupo de individuos que se denominan razas geográficas o subespecies. Las principales razas geográficas introducidas a América fueron: La abeja negra o alemana *A. mellifera*, La abeja italiana o amarilla *A. mellifera ligustica*, La abeja carniola o cárnica *A. mellifera carniola*, la abeja caucásica *A. mellifera* (Michener, 2007).

2.1 Apicultura

La apicultura es la ciencia de la crianza de abejas de la especie *A. mellifera* con el fin de obtener productos de la colmena como la miel, el polen, los propóleos, pan de abejas, cera, jalea real y larvas, entre otros. Esta actividad es de las pocas actividades productivas en las que una mayor producción implica un mayor beneficio para el medio ambiente. Ya que la apicultura se sustenta en que las abejas visitan diferentes fuentes florales con el fin de obtener el polen y el néctar con el que elaboran la miel, y al realizar esta actividad ayudan en la polinización de una gran variedad de especies vegetales silvestres y cultivadas. Las abejas representan un importante eslabón en la naturaleza y, como agentes polinizadores, permiten la reproducción de gran número de especies vegetales y el aumento del volumen de producción y calidad de algunos frutos (Laverde *et al.*, 2010 y Vit *et al.*, 2006a). A nivel mundial, aproximadamente un tercio de la

producción mundial de alimentos depende de la polinización de insectos, el 80% de las cuales se estima que debe facilitarse por las abejas (Pimentel *et al.*, 1997).

2.1.1 Miel de abejas

La miel es una sustancia dulce natural producida por abejas obreras de diferentes especies a partir del néctar de las plantas, de las secreciones de las partes vivas de plantas o de las excreciones de insectos que succionan las partes vivas de las plantas, sustancia que las abejas recolectan, transforman mediante la combinación de sus propias sustancias específicas, depositan, deshidratan, almacenan y dejan madurar al interior de la colonia (ICONTEC, 2007). En primer lugar la abeja colecta y transporta el néctar mediante una bolsa especial denominada buche o vesícula melífica, depositándolo luego, en celdas abiertas, hexagonales, construidas con cera que segregan por medio de glándulas especiales. Son celdas bien ventiladas donde se produce pérdida de agua e hidrólisis de la sacarosa, etapa que se conoce como maduración de la miel. La ventilación lograda por el aleteo continuo de algunas abejas de la colmena, produce la concentración del néctar logrando bajar la humedad hasta un nivel de 17-20%. El desdoblamiento de los azúcares (hidrólisis), en especial de la sacarosa, se logra a través de enzimas agregadas por las abejas al néctar. Cuando el acondicionamiento ha terminado, alcanzándose el nivel óptimo de humedad, las abejas sellan las celdas con una capa de cera (Philippe, 1990).

2.1.2 Composición de la miel de abejas

La composición química de la miel varía dependiendo de la especie de abeja, origen floral del néctar, métodos de recolección y las posibles adulteraciones (Özbalci *et al.*, 2013). En la Tabla 2-1, se indican los valores promedio de composición química de una miel, según el Laboratorio de Nutrición del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2015) y la composición de miel de *A. mellifera* provenientes de cultivos de café de la Sierra Nevada de Santa Marta – Colombia donde se evidencia las diferencias de composición de la miel de abejas de acuerdo al origen geográfico.

Tabla 2-1: Comparación de la composición de la miel de *A. mellifera*

Componente en 100 g de miel	Unidad	Estándar Internacional ¹	Sierra Nevada de Santa Marta – Colombia ²
Agua	g	17.10	17.81
Proteína	g	0.30	-
Cenizas	g	0.20	0.19
Azúcares	g	82.40	80.04
Sacarosa	g	0.89	-
Glucosa	g	35.75	-
Fructosa	g	49.94	-
Sodio	mg	4	5.816
Potasio	mg	52	30.453
Calcio	mg	6	9.799
Magnesio	mg	2	2.334
Hierro	mg	0.42	0.300
Cobre	mg	0.036	-
Zinc	mg	0.22	0.248

Fuente: ¹(USDA, 2015), ²(Nieto *et al.*, 2014a; Nieto *et al.*, 2014b)

▪ Azúcares

La miel es un alimento complejo y con alta concentración de azúcares, que constituyen más del 95% de materia seca. Algunos azúcares proceden del néctar o del mielato y otros derivan de la acción de las enzimas segregadas por las abejas; durante el almacenamiento el perfil de azúcares sufre modificaciones. En general los polisacáridos se incrementan y los monosacáridos disminuyen. Se cree que esta condensación de monosacáridos ocurre tanto por acción enzimática como por la acción de ácidos debido al pH de la miel y que el proceso podría conducir a azúcares que no se encuentra normalmente en la naturaleza (Ortiz *et al.*, 1996).

El perfil de azúcares, especialmente el contenido de glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa se han asociado ampliamente a características de calidad, como la viscosidad, la higrometría, granulación y valor energético. La relación glucosa: agua: fructosa fue catalogada como uno de los principales factores que caracterizan la cristalización de la miel. El contenido de disacáridos (principalmente, maltosa y sacarosa) se ha considerado como una herramienta para la caracterización de la miel de acuerdo al origen geográfico (Özbalci *et al.*, 2013).

Disacáridos: En algunas mieles uniflorales la maltosa es el disacarido más abundante seguido por la sacarosa, cuyo valor está completamente en la legislación como indicador de buena maduración de la miel. También están presentes isomaltosa, maltulosa, turanosa, α y β trehalosa (principal carbohidrato de la linfa de algunos insectos), laminaribiosa, gentiobiosa y nigerosa (Fattori, 2004). La sacarosa es un disacarido que cuando aparece en cantidades elevadas, evidencia la inmadurez de la miel o bien la adulteración de la misma con melazas. La maltosa es el disacarido más importante con valores medios comprendidos entre 6.925% para mieles multiflores y 7.86% para las de frutales. La melibiosa, otro disacarido de interés, se presenta en un bajo porcentaje que varía entre 0.45% hasta 0.61% para las mieles poliflores (Ortiz *et al.*, 1996).

Trisacáridos y polisacáridos: Son grupos complejos de azúcares que se encuentran en proporciones muy pequeñas. En la miel se han identificado: erlosa y melezitosa (formadas por un mecanismo de transglucosidación entre glucosa y sacarosa), rafinosa, I-kestosa, teanderosa y ventosa. Un tetrasacárido: isomal-totetraosa, un pentasacárido: isomaltopentaosa polisacáridos como dextrinas y pentosanos (Fattori, 2004).

La rafinosa se considera excelente caracterizador de las mieles de bosque, se destaca su procedencia en mieles de pino. El contenido medio más bajo de este azúcar se detectó en mieles de frutales (0.07%), mientras que el más elevado corresponde a miel de romero (0.21%). La importancia del azúcar erlosa en mieles de romero es destacada en su caracterización. La melezitosa ha sido identificada en mieles de mieladas en las que aparecen en porciones importantes.

▪ Agua

El contenido de agua en la miel está relacionado con factores como el clima, la humedad relativa, el origen floral y regional, las prácticas de cosecha y recolección de la miel (Sáinz & Gomez, 2000). Es un factor importante en la calidad debido a que influye en el peso específico, en la viscosidad, características sensoriales (Piana *et al.*, 1989).

▪ Ácidos

Los ácidos contribuyen a la protección del producto frente a la proliferación de microorganismos e influye en el sabor de la miel. El ácido mayoritario en la miel es el ácido glucónico que se forma por oxidación enzimática de la glucosa. También se encuentran otros ácidos como el fórmico, acético, málico, cítrico, oxálico, tartárico, pirúvico y succínico. Se encuentran como ácidos libres y también como lactonas constituyendo estas últimas una reserva de acidez para la miel, ya que puede liberarse en caso de alcalización. El contenido de ácidos en la miel varía de acuerdo al origen de la miel (Sáinz & Gomez, 2000). Han hallado valores entre 17 y 290 mg/kg de ácido fórmico y de 11 a 119 mg/kg de ácido oxálico (Bogdanov *et al.*, 2002). Se ha demostrado que el contenido de estos ácidos varía de acuerdo con el origen de la miel. Además del ácido fórmico se han encontrado ácidos volátiles (butíricos, valérico, capríco, málico, láctico y fosfórico). La miel también contiene ácidos fenólicos entre los que se encuentra el cafeico, cinámico y ferúlico, que le confieren propiedades antioxidantes (Fattori, 2004). Todos estos ácidos tienen en común la capacidad de disociarse en solución acuosa cediendo al medio iones de hidrógeno, cuya concentración se determina mediante la medida del pH y nos da información sobre la acidez de la miel. Los valores de pH oscilan entre 3.4 y 6.4 aproximadamente (Cavia, 2002).

▪ Proteínas y aminoácidos

Los aminoácidos son buenos indicadores del origen floral de las mieles (González-Paramás *et al.*, 2006 y Iglesias *et al.*, 2004). Aunque la miel contiene pequeñas cantidades de aminoácidos y proteínas, la mayoría de estos aminoácidos son fisiológicamente importantes (Bogdanov, 2009, Cotte *et al.*, 2004b y Pérez *et al.*, 2007). Uno de los aminoácidos más relevantes es la prolina, pues es empleado como medida de madurez de la miel (Sanz *et al.*, 2003). Este aminoácido se debe encontrar con valores mayores a los 200 mg/kg, valores inferiores indican adulteración de la miel (Bogdanov, 2009).

El contenido de los aminoácidos se afecta significativamente cuando la miel es tratada térmicamente y es almacenada (Boonchiangma *et al.*, 2011 e Iglesias *et al.*, 2006). Al parecer la pérdida de aminoácidos se debe a transformaciones químicas que ocurren en las reacciones de Maillard, cuando la miel es calentada o almacenada en presencia de

luz (Díaz, 2009). Los aminoácidos 2-metilfurilo y furosina son considerados indicador de calidad en alimentos de origen frutal, pues resultan de la interacción de la glucosa con aminoácidos libres como la lisina, durante la hidrólisis ácida (Sanz *et al.*, 2001 y Sanz *et al.*, 2003).

▪ **Minerales**

El contenido de minerales en la miel oscila entre 0.1 a 0.2%, variando significativamente según el origen botánico, la especie de abejas y técnicas de cuantificación. Los minerales mayoritarios son el potasio, calcio, sodio, magnesio, hierro, zinc, cobre y manganeso (USDA, 2015).

▪ **Enzimas**

Las enzimas son moléculas proteicas que hacen parte de la composición de la miel, son segregadas por las glándulas hipofaríngeas de las abejas obreras y por los nectarios de las plantas, son de carácter termolábil y su actividad disminuye con el envejecimiento, por lo que su presencia es indicadora de calidad de la miel. La miel contiene pequeñas cantidades de diferentes enzimas, en particular, la diastasa (α - y β - amilasa), invertasa (glucosidasa), glucosa-oxidasa, catalasa y fosfatasa ácida, que provienen del néctar, fluidos salivales y las secreciones de las glándulas faríngeas de las abejas. La diastasa es la encargada de hidrolizar el almidón en maltosa. La invertasa (α – glucosidasa), que es la responsable de la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa y la glucosa – oxidasa, que actúa sobre la glucosa proveniente del ácido glucónico (Saka & Sak-Bosnar, 2012).

▪ **Pigmentos**

Los pigmentos son los responsables del color de las mieles. Se han identificado dos fracciones: hidrosoluble y liposolubles. En las mieles claras domina la fracción liposoluble y en las oscuras la hidrosoluble. En la fracción liposoluble se han encontrado carotenoides, mientras que en las hidrosolubles compuestos polifenólicos cuya oxidación da lugar a compuestos de los tonos oscuros (Sáinz & Gomez, 2000).

El oscurecimiento de una miel almacenada durante cierto tiempo podría deberse a varios factores: a la presencia de tanatos, a compuestos procedentes de los materiales empleados en la conservación, a la reacción de azúcares reductores con sustancias que

contiene nitrógeno (aminoácidos, polipéptidos y proteínas), y finalmente también intervendrían la inestabilidad de la fructosa en solución ácida y posterior proceso de caramelización. Por otro lado existen diferencias entre mieles claras y oscuras observándose en las primeras ausencia de tirosina y triptófano, que por el contrario, aparecen en las reacciones de Maillard (Sáinz & Gomez, 2000). También se han detectado flavonoides como rutina y quercetina en las oscuras (Brudzynski & Kim, 2011).

▪ **Compuestos carboxílicos, alcoholes y ésteres**

Estos compuestos volátiles contribuyen al aroma y sabor de la miel (Castro-Vázquez *et al.*, 2009) junto con los azúcares y ácidos, así como con los alcaloides procedentes de la planta originaria. Pueden ser características diferenciadoras. Dentro de los compuestos carboxílicos están: formaldehído, acetaldehído, propionaldehído, isobuturaldehído, isovaleraldehído, metacroleína y acetona. Los alcoholes más importantes son: isopropanol, etanol, 2-butanol, n-propanol, 3-pentanol, isobutanol, alcohol bencílico y 2 – metil, 1 – butanol. Y de los ésteres se destacan el metilformiato y el etilformiato (Castro-Vázquez *et al.*, 2009).

2.1.3 Propiedades de la miel de abejas

La miel cuenta con una variedad de cualidades que la hacen un producto apetecido e importante para la alimentación.

▪ **Conductividad eléctrica**

La conductividad eléctrica es la propiedad de un cuerpo de permitir el paso de corriente eléctrica. Depende de la concentración de sales minerales, de iones inorgánicos y ácidos orgánicos, macromoléculas de proteínas, granos de polen, esporas y en algunos casos mohos, mostrando valores con rango amplio según su origen floral. La conductividad es un dato útil para diferenciar mieles, observándose que las mieles florales tienen valores entre 0.1 y 0.7 mS/cm (Sáinz *et al.*, 2000).

▪ **Índice de refracción**

El índice de refracción se define como el cociente entre el seno del ángulo de incidencia ($\text{sen } i_1$) y el seno del ángulo de refracción ($\text{sen } i_2$) de la luz monocromática al pasar del aire a un medio ópticamente más denso, la refractometría resulta adecuada para

identificar y cuantificar el contenido de humedad o de azúcar (sacarosa) en la miel (Sáinz *et al.*, 2000).

- **Densidad**

La densidad de una sustancia es la relación entre la su masa y su unidad de volumen. En la miel puede medirse pesando un volumen conocido de muestra contenido en un picnómetro o utilizando un hidrómetro calibrado. Debe tenerse en cuenta que el valor de la densidad depende del contenido de agua de la muestras y de la temperatura a la cual se lleva a cabo la medición. La densidad de la miel a 20 °C varía entre 1.39 y 1.44 dependiendo del tipo de miel (Sáinz *et al.*, 2000).

- **Viscosidad**

Es la propiedad de un fluido por la que tiende a oponerse a su flujo cuando se le aplica una fuerza. La viscosidad es una característica de todas las mieles, esta varía según el origen floral. En esta propiedad influye el porcentaje de agua y la relación fructosa: glucosa, teniendo en cuenta que a mayor cantidad de fructosa las mieles son menos viscosas y a mayor cantidad de azúcares superiores mayor es la viscosidad. La viscosidad, único atributo de textura de los alimentos líquidos, es altamente dependiendo de la temperatura y su valor disminuye al aumentar ésta. Algunas mieles se comportan como alimentos líquidos con flujos newtonianos, presentando valores de viscosidad hasta 110 poises, medidos a 20 °C (Fattori, 2004).

- **Higroscopicidad**

Es un concepto que hace referencia a la capacidad de ciertas sustancias para retener y liberar agua en función de la humedad relativa del ambiente. La miel al ser una solución concentrada de azúcares posee la capacidad de absorber agua del ambiente. Por ese motivo es importante que sea almacenada correctamente ya que, de acuerdo con su contenido inicial de agua, podrá absorber o perder ésta dependiendo de la humedad relativa ambiental de su almacenamiento (Fattori, 2004).

- **Cristalización**

La cristalización de las mieles es un fenómeno físico complejo. La glucosa, que es un azúcar menos soluble que la fructosa, forma cristales primarios conformando una trama cristalina constituida por cristales enlazados entre sí. Si la cristalización sucede

rápidamente, se formarán estructuras compactas formadas por cristales muy finos, mientras que si es lenta, se formarán estructuras no compactas, formadas por cristales gruesos (Fattori, 2004).

La velocidad de cristalización de una miel, depende de varios factores de composición (Cavia, 2002). Entre esos se pueden mencionar: cuando la relación glucosa: agua es de 1.7 o inferior, la miel cristaliza muy lentamente y si esta relación es de 2.1 o superior, la cristalización es rápida. Cuando el porcentaje de glucosa es superior a 32-35%, la cristalización será rápida, si la relación fructosa: glucosa es superior a 2, la miel no cristaliza. La presencia de proteínas u otros coloides pueden actuar como núcleos de cristalización. Si estos se eliminan por filtración es posible retardar el proceso (Fattori, 2004). Las temperaturas de almacenamiento pueden provocar la cristalización, se ha encontrado que la temperatura óptima de cristalización es de 14 °C (12 – 16 °C), por el contrario a temperaturas por encima de 25 °C los cristales se redisuelven y si se hallan por debajo de 10 °C la cristalización se retrasa aunque no se evita.

Existen efectos catalíticos: la presencia de granos de polen, partículas en suspensión, cristales de glucosa, burbujas de aire, etc., hacen que la cristalización se acelere. La técnica de depuración de la miel mediante decantación, filtrado o centrifugado, es eficaz para eliminar las impurezas de la miel y con ello se frena la cristalización. También la pasterización, al eliminar las levaduras y los núcleos de glucosa, inhibe la cristalización. Finalmente hay que considerar la combinación de varios factores: viscosidad – contenido de agua – temperatura. Una miel con alta viscosidad, bajo contenido de agua y baja temperatura de almacenamiento, presenta unas condiciones no idóneas para la proliferación de los cristales de glucosa, y con ello, la granulación.

▪ Presión osmótica

La presión osmótica es la mínima presión necesaria para impedir el paso de las moléculas del disolvente puro hacia una disolución a través de una membrana semipermeable. Si una dilución se pone en contacto con su disolvente, o con una disolución más diluida, a través de una membrana semipermeable que solo deje pasar las moléculas del disolvente, la homogenización del sistema no se puede realizar y tiene lugar un flujo neto de disolvente hacia la disolución más concentrada. Este fenómeno se

conoce como ósmosis directa y la presión mínima necesaria para detener el flujo de disolvente puro a través de la membrana semipermeable es la presión osmótica.

La composición química y principalmente los hidratos de carbono, convierten a la miel en un alimento con alta presión osmótica. Esta propiedad conjuntamente con el pH ácido contribuye al poder antimicrobiano de la miel. La elevada osmolaridad del producto unido a la presencia de ácidos orgánicos e inhibida (factor antibiótico), hacen de la miel un medio desfavorable para el desarrollo microbiano y, como consecuencia, lo convierten en un alimento de alta vida útil (Fattori, 2004).

- **Rotación óptica específica**

Es la óptica de desviar el plano de polarización de la luz. La presencia de hidratos de carbonos en la miel le confiere a ésta la propiedad de desviar el plano de polarización de la luz. Dentro de los glúcidos, la fructosa es la que está en mayor proporción en la mayoría de las mieles, lo que convierte a este alimento en una solución de azúcares levógira (desvío del plano de polarización hacia la izquierda). Existen mieles que poseen naturalmente un contenido mayor de glucosa o bien que están adulteradas con cantidades elevadas de jarabe de glucosa, y como consecuencia desvían el plano de polarización hacia la derecha (dextrógiras). La medición de la rotación específica se realiza mediante un polarímetro y permite conocer el origen botánico de la miel, ya que las que son monoflorales presentan valores característicos de esta propiedad (Fattori, 2004).

2.1.4 Parámetros de calidad de la miel de abejas

Para la evaluación de la calidad de miel de abejas se disponen de parámetros fisicoquímicos como: acidez libre y láctica, humedad, cenizas, color, contenido de azúcares reductores, diastasa, hidroximetilfurfural (HMF), fenoles totales, pH, sólidos insolubles en agua. Desde el punto de vista de seguridad microbiológica se consideran: Recuento de mesófilos aerobios, mohos, levaduras, *Salmonella*, coliformes totales y fecales, esporas de anaerobios sulfito reductores, bacterias ácido lácticas y *Clostridium perfringens*. En cuanto a la calidad sensorial se tienen en cuenta parámetros como: color, olor, aroma, textura, sabor, presencia de cristales y de defectos.

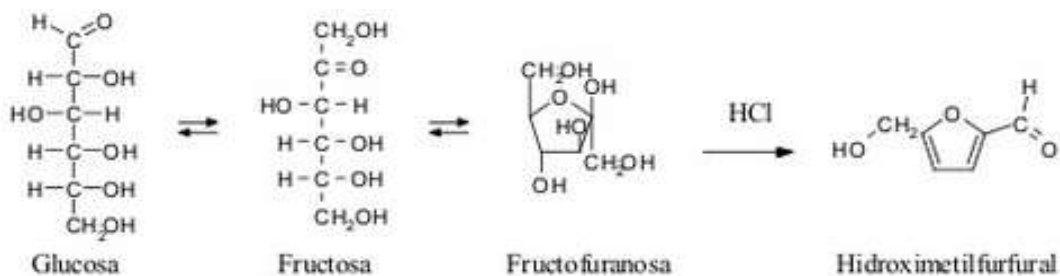
▪ Parámetros de calidad fisicoquímica

En los parámetros fisicoquímicos de calidad de la miel de abejas se encuentra el HMF, actividad diastasa, ácida, pH, humedad, cenizas, color, sólidos insolubles en agua, fenoles totales y se describen a continuación:

HMF: se utiliza como un indicador de calentamiento alimentos que contienen azúcares como el caso de la miel de abejas. El HMF resulta de la descomposición de los azúcares de hexosa, tales como glucosa y fructosa, en medio ácido (Gobierno Federal de México, 2010). El agua eliminada en el C-3 y, posteriormente, en el C-4 conduce a 1,2-diulose (3,4-dideoxyosone), que después de ciclación a un hemiacetal, un dihy-drofuran, libera otra molécula de agua, produciendo HMF (Belitz *et al.*, 2009).

Muchos investigadores han empleado la detección de HMF como indicador de calidad y de frescura de la miel, ya que este compuesto se incrementa cuando la miel se ha sometido a altas temperaturas por intervalos de tiempo cortos o temperaturas inferiores a 70 °C por largo tiempo (Fallico *et al.*, 2004, Oliveira *et al.*, 2012, Rotarescu & Vidican 2010 y Tosi *et al.*, 2004).

Figura 2-1: Formación de HMF a partir de glucosa y fructosa en medio ácido



Diastasa: La diastasa es una de las enzimas más importantes en la miel porque es capaz de romper enlaces glicosídicos en oligo – y polisacáridos por lo cual ayuda a mantener el equilibrio de los azúcares en la miel evitando de esa forma los fenómenos de cristalización. La actividad de ésta enzima disminuyen con el calentamiento y el tiempo de almacenamiento de la miel (Brudzynski & Kim, 2011), por lo tanto, la actividad diastasa indica el grado de frescura de la miel (Gobierno Federal de México, 2010). Esta

enzima se utiliza como indicador de calidad debido a su sensibilidad al calor (Cotte *et al.*, 2004, Subramanian *et al.*, 2007 y Tsigouri & Passaloglou, 2000).

Acidez: La acidez se debe principalmente a los ácidos orgánicos presentes en la miel que se encuentran en equilibrio con sus lactonas y con algunos iones inorgánicos (fosfatos, sulfatos, cloruros y nitratos). El origen de estos ácidos esta principalmente en las reacciones enzimáticas que tienen lugar durante la maduración y almacenamiento del producto. La acidez es una característica importante de la miel, ya que la protege frente al ataque microbiano y contribuye a darle aroma y sabor así como le confiere propiedades antibacterianas y antioxidantes.

En la miel pueden distinguirse tres tipos de acidez: libre, láctónica y total, todas ellas influenciadas por el origen botánico. La acidez libre de la miel proviene de todos los ácidos en estado libre. La acidez también se relaciona con la probable fermentación por desarrollo de microorganismos, pues durante las fermentaciones los azúcares de la miel se transforman en alcoholes y ácidos por acción de levaduras. La acidez láctónica puede considerarse como una reserva potencial de acidez ya que la reserva en lactonas origina ácidos cuando la miel se alcaliniza. Las lactonas están constituidas básicamente por las glucolactonas, que están en equilibrio con el ácido glucónico formado por acción de la glucosa oxidasa. Ambos tipos de acidez aumentan durante el almacenamiento, siendo mayor el incremento de las lactonas que de los ácidos libres. Durante el envejecimiento de la miel se da un aumento de la acidez debido a la acción de la glucosa oxidasa, que transforma los azúcares en ácidos. La suma de la acidez libre y la acidez láctónica se denomina acidez total (Cavia *et al.*, 2007).

pH: La evaluación del pH resulta de máximo interés durante los procesos de extracción y almacenamiento, no solo por su influencia sobre el desarrollo microbiano y el contenido enzimático, sino por su capacidad para alterar las propiedades físicas y reológicas de la miel, su textura, la viscosidad o su resistencia a las agresiones externas (Cavia *et al.*, 2007).

Humedad: Existen diversas razones por las que puede incrementarse el porcentaje de humedad, la más común es la cosecha de la miel antes de que alcance la humedad adecuada (falta de maduración de la miel en panal). También puede originarse durante la

extracción y al exponerla durante mucho tiempo en ambientes húmedos, aunque con cierta frecuencia también puede atribuirse al almacenamiento de la misma en condiciones inadecuadas. Un alto porcentaje de agua favorece el desarrollo de mohos y levaduras, por lo que la miel con altos porcentajes de humedad se fermenta fácilmente (Gobierno Federal de México, 2010).

Cenizas: El contenido de cenizas está directamente relacionado al contenido de minerales de la miel. El contenido de minerales en relación con otros componentes de la miel es relativamente bajo, su contenido es de 0.1 al 0.2%, variando notablemente según el origen botánico, las condiciones edáfico-climáticas y las técnicas de extracción. Es por tanto, que un elevado contenido de cenizas está relacionado con problemas de higiene (tierra y arena). La miel adulterada con melaza también puede presentar un alto porcentaje de cenizas (Gobierno Federal de México, 2010).

Color: El color de las mieles puede ser debido a la presencia de pigmentos como carotenos, xantofilas y a compuestos fenólicos, como flavonoides, que se encuentran en el néctar de las flores. Aunque también se relaciona con el contenido mineral, la materia orgánica y las temperaturas de los tratamientos térmicos y almacenamiento (Sáinz & Gomez, 2000).

Sólidos insolubles en agua: La miel es sometida a un proceso de filtración y sedimentación para eliminar restos de insectos, granos de arena, trozos de panal, restos de cera, polvo y otros sólidos insolubles. Un valor que supere el máximo de sólidos insolubles puede deberse a un filtrado inadecuado y/o problemas de higiene (Gobierno Federal de México, 2010).

Fenoles totales: los compuestos fenólicos están constituidos por un anillo aromático y al menos un grupo hidroxilo en cualquier posición. Normalmente tienen un anillo de un grupo funcional (alcohol, ácido, aldehído) que le da unas características determinadas y uno o varios sustituyentes en cualquier posición libre (Uthurry *et al.*, 2007). Las tres familias principales presentes en la miel son: ácidos benzoicos, ácidos cinámicos y flavonoides, pigmentos como la clorofila, carotenoides y derivados de los taninos son compuestos que afectan al color de la miel (Juszczak *et al.*, 2009).

▪ Calidad microbiológica

La miel de abejas puede estar contaminada con microorganismos que se encuentran alojados en el polen, el néctar, en el tracto digestivo de las abejas, en el aire, en las flores y el medio ambiente (Josiane *et al.*, 2011). No obstante las malas prácticas de cosecha de la miel e inadecuados sitios de ubicación de las colmenas también pueden ocasionar contaminación microbiológica.

Es posible dividir los microorganismos que se encuentran en la miel en tres categorías: bacterias formadoras de esporas y levaduras, contaminación de segunda fuente y microorganismos patógenos (Snowdon & Cliverb, 1996).

Bacterias formadoras de esporas y levaduras: En este tipo de microorganismos son los que más comúnmente se encuentran en la miel y se denomina contaminación de primera fuente, porque puede provenir de las abejas, material de la colmena, flores, polen, entre otros. Siendo la flora normal de los intestinos de las abejas el mayor causante de este tipo de contaminación. En este grupo de microorganismos podemos encontrar presencia: *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* y *Bifidobacterium* (Kacániová *et al.*, 2004 y Jeyaprakash *et al.*, 2005).

También se pueden encontrar gran variedad de microorganismos en las abejas (en el intestino y heces). Entre los que se destacan *Aspergillus*, *Penicillium* y *Chaetomium* (Snowdon & Cliverb, 1996). Igualmente, se encuentran levaduras que suelen ser resistentes a condiciones de acidez, son tolerantes a diferentes azúcares, por lo que son causantes de graves problemas a nivel industrial debido a que pueden incluso desarrollarse cuando la miel está madura y su contenido de agua es reducido produciendo fermentación e inmediatamente alterando la calidad del producto (Vica *et al.*, 2009).

De forma habitual también se puede encontrar bacterias del género *Bacillus* en forma esporulada, mohos pertenecientes al género de *Penicillium* y *Mucor* (Josiane *et al.*, 2011 y Róžańska & Osek, 2012) y levaduras del género *Saccharomyces* (Carvalho *et al.*, 2010, Iurlina, 2005 y Josiane *et al.*, 2011), *Shizosaccharomyces* (Carvalho *et al.*, 2010 y Róžańska & Osek, 2012).

Contaminación de segunda fuente: En esta categoría se pueden distinguir los coliformes como microorganismos indicadores de contaminación fecal o variedad de levaduras o mohos que no son típicos en la miel. La aparición de este tipo de microorganismos se origina durante o después de la extracción de la miel, siendo la manipulación, instrumentación y contenedores sucios, contacto con productos animales, agua contaminada, entre otros, las principales fuentes (Adebayo *et al.*, 2012).

Microorganismos patógenos: Entre los microorganismos patógenos que se pueden encontrar está el *Clostridium* spp. en productos sin tratamiento térmico y con mal uso de las buenas prácticas de manufactura (BPM) que puedan causar enfermedad en el consumidor. El *Clostridium* spp. se trata de un microorganismo patógeno ampliamente distribuido en el ambiente. Es posible encontrándolo en el suelo, agua, polvo y superficies. Su capacidad de patogenicidad está directamente relacionada con la producción de esporas muy resistentes que sobreviven hasta dos horas a 100°C, también cuenta con una exotoxina termolábil que puede ser inactivada aplicando ciclos de calor específicos (85°C por 1 min y 80°C por 5 min) (Castro-Domínguez, 2004).

C. botulinum ha sido relacionado clínicamente con la producción de botulismo infantil especialmente en niños menores de un año y *C. perfringens* con intoxicaciones alimentarias, por ende se recomienda no suministrar alimentos endulzados con miel a bebés, debido a que su sistema digestivo e inmunológico está todavía inmaduro por lo que las esporas logran germinar, colonizar y replicarse en el sistema digestivo, momento en el que pueden producir la neurotoxina botulínica (Herrera & Hernández, 1992).

En estudios de recuentos de microorganismos en la miel se también ha encontrado presencia de agentes patógenos como *Salmonella* (Collins *et al.*, 1999 y Rall *et al.*, 2003) y *Clostridium* sulfito-reductores (Collins *et al.*, 1999); esporas de *C. botulinum* tipo G (Nevas *et al.*, 2006 y Rall *et al.*, 2003), *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* (Iurlina, 2005) y Coliformes (Josiane *et al.*, 2011 y Rall *et al.*, 2003).

2.1.5 Producción de miel en Colombia

La producción de miel de abejas en Colombia, en 2007, fue de 1.550 toneladas, dato estimado por la FAO, representando el 0.1% de la producción mundial total. La

producción nacional no está suficientemente consolidada como para aspirar a posicionarse en el mercado internacional. De acuerdo con lo reportado por la FAO, Colombia ocupa el puesto 70 de producción mundial y las cifras han fluctuado entre las 1.500 y las 2.500 toneladas por año, en el período comprendido entre 1996 y 2007. En este mismo período, se reportó un promedio de 1.828 toneladas de miel producida anualmente (Laverde *et al.*, 2010).

La miel de abejas en Colombia se comercializa a un mayor valor en el mercado interno en comparación con mercados externos. Sin embargo, cuando se trata de mieles reconocidas internacionalmente y con ciertas propiedades, estas se comercializan a valores más altos. En el mundo, este es el caso de la miel de Manuka de Nueva Zelanda. Este hecho representa para los apicultores colombianos una limitación, porque se pueden conseguir mieles provenientes de otros países a un menor precio.

2.1.6 Normatividad para miel de abejas

La miel de abejas *A. mellifera* cuenta con unos referentes normativos para el control de calidad de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, incluyendo los métodos armonizados para la evaluación de los mismos, consignados en documentos de la IHC, en estos se promulgan métodos para evaluar las características fisicoquímicas, tales como humedad, conductividad eléctrica, cenizas, acidez libre, HMF, actividad diastasa, azúcares reductores y materia insoluble (Bogdanov, 2002). La calidad de las mieles europeas es evaluada por la normatividad específica de esa región, la cual establece requisitos adicionales a los contemplados en el *Codex Alimentarius* en cuanto al origen floral y el tipo de presentación (miel filtrada, miel en panal, miel con trozos de panal y la miel para uso industrial). En los países asiáticos especialmente China, los estándares de la calidad de la miel son asimilados del USDA, según los cuales se da relevancia a las características sensoriales (color y textura) como parámetros relacionados al origen (USDA, 2011). La miel no puede tener presencia de partes o larvas de abejas o cualquier impureza macroscópica procedente de la colmena o del recolector. Otras normas de regulación mundial establece parámetros de requisitos microbiológicas para la miel en cuanto a número total de bacterias, conteo de coliformes, mohos y levaduras, *Salmonella*, *Shigella* y *Staphylococcus aureus*.

En los países latinoamericanos existe una serie de reglamentos y normas para la evaluación de la calidad de la miel de *A. mellifera*. Tal es el caso de Bolivia – NB 38023 (INBORCA, 2006), Chile - NCh 616 (INN, 2007), Colombia - NTC 1273 (ICONTEC, 2007), Costa Rica - RTCR 423 (MAG-MEIC, 2009), Ecuador - INEN 572 (IEN, 1988), El Salvador - NSO 67.19.01 (CONACYT, 2008), México- NMX-F-036 (IMNC, 1997), Panamá - Resolución 229 (DGNTI, 2002), Venezuela - COVENIN 2136 (Fondonorma, 1984) y para Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina se cuenta con el reglamento técnico de Mercosur Resolución 56 (GMS, 1999). En Colombia, adicionalmente, existe un reglamento técnico para miel, la resolución 1057 de 2010 (Ministerio de la Protección Social, 2010). Esta resolución tiene por objeto establecer las condiciones generales de clasificación de la miel de abejas, requisitos fisicoquímicos y microbiológicos, prohibiciones, condiciones generales para la obtención de la miel de abejas y envase y rotulado. De la legislación latinoamericana para evaluación de calidad de mieles de *A. mellifera* que se mencionó anteriormente, se puede destacar que sólo las legislaciones de Chile, Costa Rica, Colombia, Panamá, El Salvador y Bolivia mencionan requisitos microbiológicos para la miel y sólo en países como Chile, Colombia y Bolivia se establece identificar la presencia de *Clostridium* sulfito reductor en muestras de miel.

En Colombia la calidad de la miel de abejas *A. mellifera* está regulada por la NTC 1273 (ICONTEC, 2007) y la resolución 1057 de 2010 (Ministerio de la Protección Social 2010), por la cual establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que debe cumplir la miel de abejas para el consumo humano. Tiene por objeto establecer las condiciones generales de clasificación de la miel de abejas, requisitos fisicoquímicos y microbiológicos, prohibiciones, condiciones generales para la obtención de la miel de abejas y envase y rotulado. En la Tabla 2-2 se presentan los requisitos fisicoquímicos de miel de abejas y en la Tabla 2-3 requisitos microbiológicos.

Tabla 2-2: Requisitos fisicoquímicos de la miel de abejas de *A. mellifera*

Requisitos	Res. 1057 de 2010	NTC 1273 de 2007	
	Valores permisibles	Valores Mín.	Valores Máx.
Sólidos insolubles en agua %	≤ 0.1 Miel diferente a la prensada ≤ 0.5 Miel prensada	-	0.5 Miel prensada 0.1 Miel diferentes a la prensada
Humedad % m/m	≥ 20 ≤ 21 Mieles tropicales	-	20
Contenido aparente de azúcar reductor, % (m/m)	≥ 45 (miel de mielato) ≥ 60 (miel floral)	60 Miel floral 45 Miel de mielada	-
Contenido aparente de sacarosa. % m/m	≤ 5 ≤ 10 Mieles tropicales	-	5
Cenizas % m/m	≤ 0.6	-	0,6
Conductividad eléctrica (mS/cm)	≤ 0.8		
Acidez libre. Meq de ácido /100 g	≤ 50	-	50
Índice de diastasa (escala Shade)	≥ 8	3	-
(HMF) mg/Kg	≤ 40 ≤ 60 mieles tropicales	-	60
Determinación de metales pesados (Cu, Cr, Cd, Pb, Hg)	Los límites máximos permitidos serán establecidos por el MPS		Pb, 0.1 mg /kg Cu, 0.05 mg/kg

Fuente: NTC 1273 (ICONTEC, 2007) y la resolución 1057 (Ministerio de la Protección Social, 2010)

Tabla 2-3: Requisitos microbiológicos de la miel de abejas de *A. mellifera*

Requisitos	n	m	M	c
Recuento de microorganismos mesófilos, UFC/g	5	100	300	3
Recuento de <i>Coliformes</i> en placa, UFC/g	5	<10	10	1
Recuento de <i>E. Coli</i> , UFC/g	5	<10	-	0
Detención de <i>Salmonella</i> / 25 g	5	Ausencia	-	0
Recuento de Hongos y levaduras, UFC/g	5	10	100	2

Fuente: NTC 1273 (ICONTEC, 2007) y la resolución 1057 (Ministerio de la Protección Social, 2010). n= número de muestras por examinar, m= índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad, M= índice máximo de muestras permisibles con resultado entre m y M, c= número máximo de muestras permisibles con resultado entre m y M.

2.2 Meliponicultura

La meliponicultura hace referencia a la crianza y aprovechamiento de abejas sin aguijón. En Brasil hay alrededor de 400 especies de meliponinos y muchos otros se encuentran en el mundo tropical (con más de 70% se producen en las Américas). Aunque la cantidad

de miel obtenida a partir de una colonia de abejas sin aguijón no es alto en comparación con las abejas africanizadas, las abejas sin aguijón tienen ventajas tales como: (1) son más adecuados para la polinización de los árboles de los bosques y cultivos nativos de países tropicales, (2) su miel tiene un mejor precio en el mercado, como producto orgánico, con las particularidades de sabor y aroma, que dependen de flora y especies de abejas. Tienen diferentes hábitos de colecta de alimento en comparación con las abejas africanizadas, varía la composición de su miel (Almeida-Muradian, 2013).

2.2.1 Abejas sin aguijón

Las abejas de la subfamilia Miliponinae (Hymenoptera, Apidae), son conocidas como “abejas sin aguijón” ya que poseen su órgano de defensa (aguijón) atrofiado, por lo tanto, son incapaces de introducir su estilete. Se encuentran en América del Sur, América Central, Asia, Islas del Pacífico, Australia, Nueva Guinea y África. Taxonómicamente están subdividida en dos tribus: Meliponini formada apenas por el género *Melipona*, encontrado exclusivamente en la región Neotropical (América del Sur, Central e Islas del Caribe) y Trigonini que agrupa a un gran número de géneros estando distribuida en toda el área de distribución de la subfamilia. Todas las especies de Miliponinae son sociales, esto es, que viven en colonias constituidas por muchas operarias y que realizan las tareas de construcción y manutención de la estructura física de la colonia, colecta y procesamiento del alimento, cuidado con la cría y defensa del nido. También por la reina (en algunas pocas especies son encontradas hasta cinco) y es la responsable por la postura de los huevos que van a dar origen a hembras (reinas y obreras) y a por lo menos parte de los machos (en diversas especies parte de los machos son hijos de obreras). Los machos son producidos en gran número en ciertas épocas del año y pueden realizar esporádicamente algunas tareas dentro de la colonia, además de fecundar a la reina, durante el vuelo nupcial. Normalmente algunos días después de nacer (cuando la abeja ha terminado su desenvolvimiento y sale de su celda) los machos son expulsados de la colonia (Feversani, 2011).

La inmensa mayoría de las abejas se alimenta de productos obtenidos de las flores. Los meliponineos colectan néctar de las flores y por deshidratación y acción enzimática lo transforman en miel que es almacenado en la colonia. La miel de abejas sin aguijón presenta una composición diferente de la miel de *A. mellifera*. Es más fluida y cristaliza

más lentamente. La cantidad de miel almacenada en la colmena varía mucho, habiendo especies que almacenan cantidades muy pequeñas, como es el caso de *Leurotrigona*. Algunas especies de *Melipona* almacenan cantidades mayores, éstas son criadas para fines comerciales, como es el caso de *Melipona compressipes* (Tiúba). El principal alimento proteico para las abejas adultas y sus larvas es el polen.

Pero las especies de *Trigona* del grupo necrófaga no visitan flores, sino utilizan en su alimentación carne fresca de animales muertos. En sus nidos no son encontrados miel o polen, apenas productos derivados de la carne colectada. Aunque poco conocidas las abejas sin aguijón juegan un papel muy importante en la polinización de especies endémicas; en Brasil por ejemplo, se estima que son las principales responsables de la polinización de muchas especies sin aguijón de árboles (Kerr, 1997). La polinización es un servicio ecológico clave para el mantenimiento y conservación de los ecosistemas y pueden actuar como biomarcadores de la calidad del medio ambiente (Ballivián, 2008 y Silva & Paz, 2012). Las abejas sin aguijón presentan colonias pobladas y perennes y por eso exploran un amplio espectro de flora a lo largo del año, razón por la que son consideradas especies generalistas (Michener, 1979).

La abeja sin aguijón Jataí (*Tetragonisca angustula*) tiene un nido característico y un tubo de entrada de cerumen. Es una de las especies meliponinos de anidación más adaptable. Ellos viven en las ciudades, bosques vírgenes, y vegetación secundaria, bajo la tierra, en los árboles, y en los huecos entre las rocas. La miel Jataí es recogida por la perforación de los pots de miel. Como medida de precaución sanitaria, la miel se extrae de los pots cerrados, que se considera "miel madura", para evitar la absorción de la humedad y, el consiguiente deterioro. A pesar de que producen miel en menor cantidad, los meliponines suministran un producto variado en comparación con la miel común de *A. mellifera*, debido a sus flavours especiales. *T. angustula* produce una miel muy apreciada por los consumidores pues es utilizada para tratamientos terapéuticos incluyendo oftálmica y usos pulmonares (Michener, 1979).

Se cree que en el neotrópico hay casi 6000 especies de abejas, de las cuales 1000 especies aproximadamente podrían encontrarse en Colombia, agrupadas en 90 géneros y cinco familias. Entre estas especies de abejas, existen dos grandes grupos de abejas

productoras de miel: aquellas con aguijón (*A. mellifera*) (Nates-Parra, 2001 y Feversani, 2011).

En Colombia hay aproximadamente 120 especies de abejas sin aguijón, pertenecientes a 14 géneros y 9 subgéneros, distribuidas desde el nivel del mar hasta los 3400 msnm, concentradas especialmente entre los 500 y 1500 msnm. En la Tabla 2-5, se encuentra una lista de las especies encontradas en Colombia, donde se identifican los departamentos, altura sobre el nivel del mar (msnm) ubicación, número de nidos y nombre común (Nates-Parra *et al.*, 2013).

Tabla 2-4: Lista actual de las principales especies, nombres comunes y distribución de las abejas sin aguijón utilizadas en meliponicultura en Colombia.

Taxón	Distribución encontrada	Rango altitudinal encontrado (msnm)	No colonias manejadas	Nombres locales reportados
<i>Frieseomelitta</i> spp. Ihering, 1912	ATL+ (u), CAL+, HUI+, SAN+, SUC (u)	100 - 1150	25	angelita negra, chulita, negrita
<i>Melipona</i> (<i>Eomelipona</i>) marginata Lepeletier, 1836 *	BOY	1050	1	ND
<i>Melipona</i> (<i>Melikerria</i>) grandis Guérin, 1844	MET, SAN+	160 - 750	4	ND
<i>Melipona</i> (<i>Melikerria</i>) salti Schwarz, 1932 #	CAL+ (u), SAN+	750 - 1150	7	abejorro (CAL), guanota, guare guare
<i>Melipona</i> (<i>Melipona</i>) favosa Fabricius, 1798	ATL+, SUC+ (u)	100-200	15	canato, cargabarro, rabipintada
<i>Melipona</i> (<i>Melipona</i>) phenax Cockerell, 1919	HUI+	450	1	Carga barro, rabipintada
<i>Melipona</i> (<i>Michmelia</i>) costaricensis Cockerell, 1919 *	SAN	1080 - 1150	17	guanota, sapa
<i>Melipona</i> (<i>Michmelia</i>) ebúrnea Friese, 1900	BOY (u), CAL+ (u), CAU+, CUN, HUI+, MET+ (u)	160 - 1420	48	abeja real amarilla, abejorro o abejorro, alazán (CAL), alá, boca de sapo, PUT+, SAN+, TOL+ guanota, guare, sapa
<i>Melipona</i> (<i>Michmelia</i>) nebulosa Camargo, 1988	VAU+	200	1	nití dobea (VAU [bará])
<i>Melipona</i> (<i>Michmelia</i>) nigrescens Friese, 1900 #	ANT (u)	1580 - 1700	2	abeja de castilla negra, abejorra
<i>Melipona</i> (<i>Michmelia</i>) cf. rufescens Friese, 1900	VAU	200	4	tõ dobea (VAU [bará])
<i>Melipona</i> (<i>Michmelia</i>) fulva Lepeletier, 1836	CAL, VAU	200 -750	3	abejorro alazán (CAL), tõ beroa (VAU [tatuyo])

Continuación de la Tabla 2-4

<i>Melipona</i> (<i>Michmelia</i>) <i>paraensis</i> Ducke, 1916	ANT	1240	2	boca de sapo
<i>Melipona</i> (<i>Michmelia</i>) spp.	BOY	1050	1	ND
<i>Nannotrigona melanocera</i> Schwarz, 1938	MET (u)	610 - 750	7	angelita
<i>Nannotrigona mellaria</i> Smith, 1862	ANT+ (u), CAU+, CUN, MAG+, SAN+	1100 - 1590	47	angelita, casira (SAN), mosquitos
<i>Nannotrigona testaceicornis</i> Lepeletier, 1836	ANT, CES (u), MAG	1100 - 1700	4	la de churumbela larga (ANT)
<i>Nannotrigona tristella</i> Cockerell, 1922 *	SAN	1080	4	zaragoza (SAN)
<i>Nannotrigona</i> Cockerell, 1922	CAU+, HUI+, SAN+, VAL (u)	450 - 1810	9	mosquitas o mosquitos
<i>Oxytrigona</i> spp. Cockerell, 1917	MET+	750	1	candela (CUN), miona (CUN)
<i>Paratrigona anduzei</i> Schwarz, 1943	SAN+	1560	1	minui (CUN), yuquina (SAN)
<i>Paratrigona eutaeniata</i> Camargo y Moure, 1994 #	ANT+, SAN (u), TOL	1310 – 1710	22	angelita de cafetal, casira (SAN), enredadora, lambeojo, yuquina (SAN)
<i>Paratrigona lophocoryphe</i> Moure, 1963	MAG+, SAN+	1100 – 1560	4	abeja de café, casira (SAN), yuquina (SAN)
<i>Paratrigona opaca</i> Cockerell, 1917	BOY, SAN	1150 – 1980	13	angelita, chatón, chupasudor
<i>Paratrigona rinconi</i> Camargo y Moure, 1994 #	CAU+ (u), VAL	1750 - 2250	42	angelita, mosquitos, pegadilla (VAL)
<i>Paratrigona</i> Schwarz, 1938	ANT, CUN, SAN	1410 – 2100	24	colmenita de árbol, mierda'e perro (CUN), perrera (CUN), piojita, rumina (CUN)
<i>Partamona</i> Schwarz, 1939	SAN+	1150	3	barranquera, bocona, chatona (SAN), colimula, cortapelo, cubreparedes, tierrera (CUN)
<i>Plebeia</i> spp. Schwarz, 1938	ANT+, CAL+, SAN+, VAL+	750 – 1790	10	lambeojo, angelita
<i>Scaptotrigona barrocoloradensis</i> Schwarz, 1951 *	CAU (u), SUC (u)	190 - 1290	30	conga (CAU), enredapelo
<i>Scaptotrigona ochrotricha</i> Buysson, 1892	MET, SAN, TOL	610 - 1350	5	angelita, chatona (SAN), enreda
<i>Scaptotrigona tricolorata</i> Camargo, 1988	ATL+	100	1	picabarba
<i>Scaptotrigona</i> spp. Moure, 1942	ANT+ (u), CAL+ (u), CES (u), CUN, MAG+, VAL+	750 - 1790	35	cañuto, enreda, enredadora, enredapelo, mongolita, negrita, repelador, tacayá(CUN), vinagrillo (CUN)

Continuación de la tabla 2-4

<i>Scaura longula</i> Lepeletier, 1836	MET	750	1	angelita negra
<i>Tetragona</i> spp. Lepeletier y Serville, 1828	CES+ (u), CUN+, SAN	1100 - 1410	6	mulata, resina
<i>Tetragonisca angustula</i> Latreille, 1811	ANT (u), ATL+ (u), BOY (u), CAL (u), CAU+ (u), CES (u), CUN, HUI, MAG, MET (u), SAN (u), SUC+ (u), VAL	100 – 1900	526	angelita, angelita mona, verdadera angelita, propia angelita, “meliponas”
<i>Trigonisca</i> spp. Moure, 1950	ANT+	1240	1	zaragoza (SAN)

Fuente: Nates-Parra *et al.*, 2013. **Taxón:** # especie descrita de Colombia. **Distribución (departamentos):** **ANT** Antioquia; **ATL** Atlántico; **BOY** Boyacá; **CAL** Caldas; **CAU** Cauca; **CES** Cesar; **CUN** Cundinamarca; **HUI** Huila; **MAG** Magdalena; **MET** Meta; **PUT** Putumayo; **SAN** Santander; **SUC** Sucre; **TOL** Tolima; **VAL** Valle del Cauca; **VAU** Vaupés; **+** nuevo registro en ese departamento; **(u)** cultivada en ambientes urbanos o semiurbanos. **Se especifica un departamento entre paréntesis** cuando hay indicios de su utilización parcial o totalmente restringida a esa región para determinados taxones, aún si no se encontraron colonias manejadas; **ND:** no hay información.

México, Australia, Brasil, Costa Rica, Bolivia y Colombia en donde se ha reportado el aprovechamiento del cultivo de abejas sin aguijón, hoy se crían especies diferentes a las que tradicionalmente se han usado para la obtención de miel y otros productos para consumo, mercadeo o uso medicinal. Esto puede ser consecuencia de la reciente adopción de la meliponicultura como pasatiempo o proyectos educativos, y que algunas especies han comenzado a cultivarse con el propósito casi exclusivo de su uso como polinizadores de cultivos (Venturieri *et al.*, 2012; Aguilar *et al.*, 2013; Ayala *et al.*, 2013; Halcroft *et al.*, 2013). En la Tabla 2-6 se presentan el número estimado de especies cultivadas en Colombia y otros países (Nates-Parra *et al.*, 2013).

Tabla 2-5: Número estimado de especies de abejas sin aguijón y número de especies cultivadas en Colombia y otros países en los que se desarrolla la meliponicultura.

Región	(a) Especies estimadas	(b) Especies cultivadas (%)	Referencias
Colombia	120	34 (28)	(a) Nates-Parra, 2005; (b) Ascencio, 2014
Argentina	33	11 (33)	(a) y (b) Roig-Alsina <i>et al.</i> , 2013
Australia	15	7 (47)	(a) Ascher y Pickering, 2013; (b) Halcroft <i>et al.</i> , 2013
Brasil	237	32 (14)	(a) Ascher y Pickering, 2013; (b) Venturieri <i>et al.</i> , 2012
Costa Rica	58	20 (34)	(a) y (b) Aguilar <i>et al.</i> , 2013
México	46	12 (26)	(a) Ayala <i>et al.</i> , 2013; (b) González-Acereto <i>et al.</i> , 2006; Ayala <i>et al.</i> , 2013
Perú	100	7 (7)	(a) Ascher y Pickering, 2013; (b) Rasmussen y Castillo, 2003

Fuente: Nates-Parra *et al.*, 2013

En un estudio realizado en los meliponarios de los departamentos de Santander, Huila, Boyacá, Antioquia, Cundinamarca, Caldas y Magdalena se encontró presencia de 14 especies de abejas sin aguijón, en las cuales el mayor número de colmenas pertenecen a la especie *T. angustula* (70.4%), *Paratrigona* (9.9%), *Melipona ebúrnea* (9.2%), *Nanotrigona* 3.9%). También encontró que las especies que tienen mayor producción de miel por colmena/año son *Melipona ebúrnea* (1.7 L), *Melipona* spp. (1 L), *T. angustula* (0.65 L), *Paratrigona* (0.26 L) y *Nanotrigona* (0.13 L) (Ascencio, 2014).

Sin embargo, las abejas sin aguijón utilizadas para la explotación de miel corresponden principalmente a *T. angustula* y algunas especies del género *Melipona*. Estas especies no compiten en cantidad con la producción de miel de la abeja *A. mellifera*, pero se cree que tienen características especiales y se vende a precios bastante altos; su precio va desde 5 hasta 80 USD por litro (Ramos-Elorduy *et al.*, 2009). En países como Brasil, Costa Rica, Indonesia, México y Paraguay aunque existen precios y rendimiento por colmena diferentes por especie de abeja sin aguijón y la ubicación geográfica, como se muestra en las Tablas 2-7 y 2-8, siendo la especie *Melipona* spp la mayor productora de miel y la miel de especie *T. angustula* la de mayor precio por kilo.

Tabla 2-6: Precios de miel de acuerdo a la especie y ubicación de producción en Brasil

Especie de Abejas	Precio (USD/kg)	Localidad
<i>Melipona asilvai</i>	7 - 10	Bahía
<i>Melipona compressipes</i>	10 - 18	Maranhao
<i>Melipona fasciculata</i>	7 - 9	Pará
	7	Manaus
<i>Melipona flavolineata</i>	10 - 13	Piauí
	9 - 12	Amazonas y Pará
<i>Melipona mandacaia</i>	7 - 12	Sao Paulo
<i>Melipona mondury</i>	10 - 18	Bahía
<i>Melipona quadrifasciata</i>	9 - 21	Bahía
<i>Melipona scutellaris</i>	10 - 18	Bahía
	25	Alagoas
	35	Pernambuco
<i>Melipona subnitida</i>	7 - 10	Bahía
	12 - 18	Rio Grande do Norte
<i>T. angustula</i>	21 - 32	Bahía / Pará
<i>Scaptotrigona</i> spp.	7 - 10	Bahía / Pará

Fuente: Modificado de (Alves, 2013).

Tabla 2-8: País de origen y la producción de miel estimada por las abejas sin aguijón

País	Especie	Producción anual kg
Australia	<i>Trigona carbonaria</i>	1
	<i>Tetragonula</i>	1
	<i>Carbonaria.</i>	1
	<i>Austroplebeia australis</i>	1
Brasil	<i>Melipon aasilvai</i>	1
	<i>Melipona fasciculata</i>	3 – 4
	<i>Melipona flavolineata</i>	0.91
	<i>Melipona mandacaia</i>	0.91
	<i>Melipona scutellaris</i>	2-15
	<i>Melipona subnitida</i>	1.134
	<i>Scaptotrigona</i>	1.361
	<i>T. angustula</i>	0.454
Costa rica	<i>Melipona“ fasciata”</i>	2.5
	<i>Melipona beecheii</i>	2.5
Indonesia	<i>Trigona</i>	1
México	<i>Melipona beecheii</i>	2.5
Paraguay	<i>Scaptotrigona</i>	1.361

Fuente: Modificado de Alves, (2013).

2.2.2 Proceso de cosecha de la miel de abejas sin aguijón

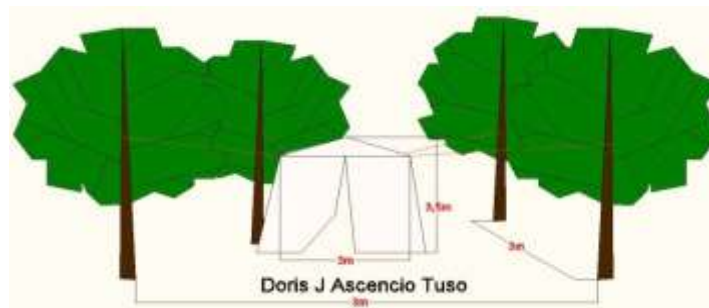
Para la extracción de la miel de abejas sin aguijón de acuerdo a las BPM se han establecido una indicaciones, que se deben tener en cuenta (Ascencio, 2014). A continuación se realiza la descripción de las recomendaciones del proceso de extracción:

▪ Adecuación del espacio para realizar la extracción

Se selecciona un terreno cercano a las colmenas, de aproximadamente 5 m x 5 m, preferiblemente sin pendientes y protegido por sombra de árboles, con el fin de ofrecer condiciones confortables para el trabajo. Se ubican árboles, postes o paredes los cuales ayudarán a facilitar la adecuación del lugar. Es necesario que el lugar cuente con fácil acceso a una fuente de agua potable, para realizar dichas actividades. Se instala un toldillo de color blanco, elaborado con velo o cortina milano (tamaño de poro de 3 entre 0.1 y 0.3 cm), cuyas dimensiones aproximadas son: alto 3.5 m, largo 3 m, ancho 2 m. En frente, la tela se debe encontrar dividida en dos. El techo del toldillo debe ser rectangular y elaborado en tela impermeable, con el fin de proteger el área de humedad y del sol (Figura 2-3). El techo debe contar con un pliegue de abrir y cerrar, con el fin de dejar una salida para las abejas que logren entrar al sitio de cosecha. Los cuatro vértices del techo del toldillo deben tener cuerdas de aproximadamente 6 metros de longitud, estas para

amarrar el mismo a puntos ubicados en el lugar para tal fin (árboles, postes, paredes). La parte inferior del toldillo, no debe quedar al ras del piso, es necesario que quede un sobrante, el cual ayudará a proteger de la entrada de insectos a la carpa. En caso de que el toldillo quede muy bajo, se puede aumentar su altura, por medio de varas de madera, las cuales se colocaran en las cuerdas de soporte (Ascencio, 2014)

Figura 2-2: Adecuación del espacio para realizar la extracción de la miel de abejas sin aguijón.



Fuente: Ascencio, (2014)

▪ Instalación de implementos y utensilios dentro del toldillo

Dentro del toldillo se debe encontrar una mesa provista con un mantel de tela blanca. Sobre la mesa deben encontrarse los utensilios necesarios para la cosecha, como espátula y cuchillo de acero inoxidable; recipiente para filtrado y envasado de miel, de aproximadamente 8 litros, un filtro que puede ser elaborado con el mismo material del toldillo o de acero inoxidable el cual será adaptado al recipiente de filtrado, succionadores y punzones en acero. El material usado para dicho fin no debe ser absorbente, que no despidan motas y de fácil lavado. Los implementos deben estar higiénicamente lavados (Ascencio, 2014).

Figura 2-3: Instalación dentro del toldillo de los utensilios con los que se realizara la extracción de la miel de abejas sin aguijón.



Fuente: Ascencio, (2014)

▪ Indumentaria del personal que realiza la extracción

El personal que realice la operación de extracción debe encontrarse debidamente presentado y limpio; debe llevar bata u overol de color claro, preferiblemente blanco, cofia, tapabocas, guantes desechables y botas de caucho de color claro. Esto para evitar la contaminación cruzada, causada por la manipulación de herramientas y materiales. Quien realice la cosecha no deberá tener contacto con la colmena. Quien manipule las colmenas, debe cumplir los requisitos mínimos de higiene, no es necesario el uso del mismo tipo de indumentaria de quien se encuentra en contacto directo con la miel (Ascencio, 2014).

Figura 2-4: Indumentaria del personal que realizara la extracción de la miel de abejas sin aguijón.



Fuente: Ascencio, (2014)

- **Descenso y apertura de las colmenas**

El meliponario debe estar ubicado en un sitio de fácil acceso para su manejo, de tal forma que la manipulación no cause trastornos al nido. Dependiendo de la zona geográfica estas colmenas deben ser ubicadas ya sea en repisas o colgadas con distancias entre ellas de mínimo de 50 cm, esto con el fin de evitar el ingreso de plagas y depredadores. La altura promedio de ubicación está entre 1.5 a 3.5 m (Ascencio, 2014).

Se debe contar con herramientas como: espátula mediana en acero inoxidable, cuchillo y pinzas pequeñas y tijeras, estas son de gran utilidad debido a que hacen más fácil la labor de revisión de las colmenas. Es necesario tener cuidado en el descenso de las colmenas, ya que estas no deben ser inclinadas, volteadas, ni giradas debido a que se puede causar mortalidad de los huevos y las larvas, las cuales se encuentran flotando dentro en la superficie del alveolo cerrado de los discos de cría (Ascencio, 2014).

- **Partición de potes por escurrido**

Se cortan los potes en fracciones pequeñas, verificando que estos queden abiertos, se colocan sobre un filtro de acero inoxidable o un lienzo blanco esterilizado. Es necesario no dejar ningún pote de polen dentro de la sección de escurrido, ni dejar caer restos de polen dentro de los potes de miel (Ascencio, 2014).

- **Punzado y escurrido**

Se toman los potes y se les abre un orificio en la parte superior con la ayuda de un punzón de acero inoxidable, se colocan girados para que escurra la miel sobre el lienzo (Ascencio, 2014).

- **Con pipeta o succión**

Se toman los potes y se les abre un orificio en la parte superior con la ayuda de un punzón de acero inoxidable, se toma una pipeta o succionador y se procede a realizar la extracción de cada uno, finalmente el contenido de la pipeta se vierte en el filtro (Ascencio, 2014).

- **Envasado de la miel**

Este se realiza luego del filtrado y decantado de la miel, se hace directamente en frascos de vidrio, preferiblemente opacos, posteriormente se realiza el método de conservación

más conveniente, de no ser posible realizarlo inmediatamente, se debe refrigerar (Ascencio, 2014).

2.2.3 Potencial productivo de la miel de abejas sin aguijón en Colombia

En Colombia, antes del descubrimiento de América, la miel de las abejas sin aguijón era la principal fuente de azúcares, la cera era usada para moldear joyería en oro empleando la “fundición a la cera perdida” (Vit, 1999, Toriz & Roman, 2005 y Jones, 2013). El auge de la orfebrería en la zona central de Colombia presume grandes volúmenes de cera de abejas sin aguijón y una probable organización en su proceso productivo. La colonización de Centro y Sur América por parte de Europa minimizó la crianza de abejas sin aguijón y en Colombia prácticamente se anuló, pues prevaleció *A. mellifera* para la producción de miel (Crane, 1992, Rosso & Nates-Parra, 2005 y Rodríguez, 2007).

Actualmente, se encuentra producción de miel de abejas sin aguijón en los departamentos de Antioquía, Boyacá, Caldas, Cundinamarca, Huila, Magdalena y Santander. El mayor volumen de producción de miel por meliponario al año, es obtenido de la especie *T. angustula* el 70.06% (385.4 L) de la producción total de miel de abejas sin aguijón en el país. El volumen total de esta especie se compone principalmente de 190.5 L/año producidos en Antioquia, 61 L/año en Santander y 68 L/año en Magdalena. De acuerdo a la importancia de producción de miel por volumen, el segundo puesto lo tiene la especie *Melipona ebúrnea* con un 24.08% (132.5 L/año) y tan solo el 5.86% es producido por otras especies (Ascencio, 2014).

No obstante, el valor de la miel en el mercado es una función de la calidad, la presentación, y más recientemente, certificación como productos orgánicos, lo que aporta un valor añadido y puede aumentar el precio en un 50%. El precio de la miel varía según el sitio y la producción de especies como se muestra en la Tabla 2-5. En Brasil el precio de la miel producida por las abejas sin aguijón puede alcanzar un valor de hasta 1.1 veces más alta que la miel común, que oscilan entre 6.4 y 15.6 US/kg, contra 0.47 USD/kg de miel de la tradicional *A. mellifera* en la Tabla 2-5 se puede apreciar los precios de la miel de acuerdo a la especie en Brasil. En Colombia el precio de la miel de abeja

sin aguijón de mayor comercialización es la de *T. angustula*, su precio puede alcanzar valores de 38.91 USD/kg que corresponde a 7 veces el valor de la miel de *A. mellifera*.

Entre los cientos de especies de abejas sin aguijón, algunos producen miel para satisfacer las necesidades nutricionales, necesidades de la colonia, otros producen un exceso disponible para los seres humanos. Sólo unas algunas de ellas son excelentes productores de miel, como *Melipona*, con especies de gran potencial y ampliamente mantenida en América Tropical. Pocas especies de abejas sin aguijón se han explorado en todo su potencial técnico, necesaria para aumentar la producción de anual de miel.

2.2.4 Composición de la miel de abejas sin aguijón

La miel de abejas sin aguijón está compuesta principalmente de azúcares reductores simples (principalmente fructosa y glucosa) y azúcares no reductores (principalmente sacarosa y maltosa), agua (alrededor de un 23 al 31%) y cenizas. Estos parámetros de calidad dependen de muchos factores, incluso para la misma especie, el grado de madurez alcanzado en el nido de abeja o de la colmena durante la temporada de cosecha, los factores climáticos y geográficos, y otros elementos que afectan la abundancia de flores (Enríquez *et al.*, 2006 y Fuenmayor *et al.*, 2012). En la Tabla 2-9, se presenta una comparación química de miel de abejas sin aguijón de diferentes especies frente a miel de *A. mellifera*.

Tabla 2-8: Comparación de la composición química de miel de diferentes especies de abejas sin aguijón de Colombia contra la composición química miel de *A. mellifera* procedente de la Sierra Nevada de Santa Marta y un estándar internacional

Componente	<i>A. mellifera</i> ¹⁻³		<i>T. angustula</i> ^{4,5}		<i>Melipona ebúrnea</i> ⁵	<i>Melipona sspp.</i> ⁵
Agua (g)	17.10	17.81	24.3	22.93	26.22	23.28
Proteína (g)	0.30	-	-	-	-	-
Cenizas (g)	0.20	0.19	0.21	0.38	0.31	0.12
Azúcares (g)	82.40	80.04	57.8	75.14	71.95	74.72
Sacarosa (g)	0.89	-	4.2*	-	-	-
Glucosa (g)	35.75	-	23.5	-	-	-
Fructosa (g)	49.94	-	30.1	-	-	-
Sodio (mg)	4	5.816	15.5	12.04	5.57	5.70
Potasio (mg)	52	30.453	57.66	81.31	33.34	27.79
Calcio (mg)	6	9.799	19.9	13.78	4.98	5.31
Magnesio (mg)	2	2.334	5.6	7.41	1.88	0.90
Hierro(mg)	0.42	0.300	5.8	1.46	0.453	0.26
Cobre (mg)	0.036	-	0.09	0.079	0	0.023
Zinc (mg)	0.22	0.248	1.96	0.6	1.88	0.90

Fuente: ¹(USDA, 2015), ²(Nieto *et al.*, 2014a), ³(Nieto *et al.*, 2014b), ⁴(Fuenmayor *et al.*, 2012), ⁵(Ascencio, 2014). *Disacáridos.

2.2.5 Normatividad para miel de abejas sin aguijón

Actualmente no existe normatividad que establezca los requisitos sanitarios que debe cumplir la miel de abejas sin aguijón para ser comercializada. El tema de normatividad para evaluación de calidad miel de abejas sin aguijón ha sido motivo de preocupación de meliponicultores, investigadores, autoridades y entidades interesadas en su comercialización. Algunos investigadores de Venezuela, Brasil, México, Argentina, Australia, Guatemala, Portugal, Perú y Colombia (Vit *et al.*, 2005, Vit *et al.*, 2006^a y Hernández *et al.*, 2014a), han realizado propuestas y trabajos de investigación con este propósito. Uno de los trabajos con mayor mérito en la búsqueda de este objetivo, es quizás la iniciativa de la creación de sitio Web que funciona como repositorio de trabajos a cerca de las abejas sin aguijón, realizados por investigadores científicos de varios países del mundo (Vit *et al.*, 2005).

Sin embargo, existen muchos estudios en varios países donde caracterizan fisicoquímica y microbiológicamente la miel de abejas sin aguijón que sugieren que se debe establecer una legislación sanitaria y composición individual para cada especie de abeja sin aguijón. En la Tabla 2-10 se presenta los valores sugeridos para miel de *T. angustula* en Brasil.

Tabla 2-9: Estándares normativos sugeridos para el control de calidad de la miel de Meliponinos y *T. angustula* en Brasil

Parámetros químicos	Miel Meliponini
Azúcares reductores (%)	Min. 50
Humedad (%)	Max. 35
Sacarosa aparente (%)	Max. 6.0
Sólidos insolubles (%)	Max. 0.4
Minerales (%)	Max. 0.6
Acidez (meq/kg)	Max. 85
Actividad diastasa	Min. 3.0
Hidroximetilfurfural (mg/Kg)	Max.40

Fuente: Modificado de Almeida-Muradian, (2013)

2.2.6 Mercado de la miel de abejas sin aguijón en Colombia

En Colombia la meliponicultura es una actividad informal, se desarrolla en ámbitos rurales y urbanos, sin embargo en la mayoría de los casos, no se percibe como un sistema productivo y no es una fuente de ingresos significativa. Actualmente la actividad está cobrando importancia como generadora de servicios ambientales, seguridad alimentaria e ingresos adicionales. Sin embargo, la miel de abejas sin aguijón es muy

valorada actualmente; su precio va desde 5 hasta 80 USD por litro. Se vende en diferentes presentaciones, preferiblemente en frascos de 10 o 20 ml (Ramos-Elorduy *et al.*, 2009). En Colombia, esta última presentación es muy común en la venta de miel de *T. angustula* en frasco provisto de gotero, especialmente en centros naturistas, como producto oftalmológico. Igualmente, en Bolivia, la miel de abejas sin aguijón es ampliamente utilizada en medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades oculares, respiratorias y digestivas (IBCE, 2010).

2.3 Mecanismos de deterioro en los alimentos

Todos los alimentos se deterioran. El modo en que eso ocurre puede responder a razones complejas, a menudo es normal que tenga a lugar más de un proceso. El conocimiento y comprensión de los mecanismos implicados en el deterioro de un alimento, permite al que ha desarrollado el producto o al que investiga la caducidad, identificar los factores que tienen una mayor influencia en la misma. A continuación se describen los mecanismos de deterioro más conocidos (Man, 2002).

2.3.1 Transferencia de humedad y/o vapor de agua

El agua no sólo es un medio para reacciones químicas y bioquímicas, sino que también participa en algunas de ellas. Desde el punto de vista microbiológico, el agua es uno de los factores más críticos. De igual importancia es el hecho de que el agua afecta a las propiedades sensoriales de los alimentos. Por eso, muchos alimentos tienen la capacidad de aumentar o disminuir su contenido de humedad (o vapor de agua), dependiendo del sentido en el que se realice la transferencia de vapor de agua. La transferencia de humedad o vapor de agua ocurrirá entre elementos adyacentes de un producto en la medida en la que exista un gradiente. La magnitud de ese gradiente influirá en el ritmo de transferencia (Man, 2002).

2.3.2 Transferencia física de sustancias diferentes a la humedad y/o vapor de agua

La transferencia desde o al alimento, de sustancias, diferentes a la humedad, que afecten a la seguridad y/o calidad del producto, probablemente tendrán un efecto en la

caducidad. A continuación se describen algunos efectos de cambios en la calidad debidos a este mecanismo de deterioro (Man, 2002).

- **Cambios de calidad debidos a transferencia desde el producto**

La pérdida de dióxido de carbono de las bebidas refrescantes carbonatadas envasadas en botellas de PET (Tereftalato de polietileno), causa la perdida de una de sus características. La absorción de aromas por parte del material de envasado de los zumos de naranja envasados en botellas de polietilenos de alta densidad, disminuyendo, por lo tanto, la intensidad del aroma a cítricos de la bebida (Man, 2002).

- **Cambios de calidad debidos a transferencias al producto**

Desarrollo de aromas extraños o desagradables debido a que el alimento adquiere los mismos, dependiendo del envase utilizado y del ambiente. Entre los alimentos susceptibles a este problema se encuentran las hojas de té por su gran superficie y los derivados del chocolate por su alto contenido en grasa. Sustancias como los monómeros y adictivos (en material plásticos) y metales pesados (en cartón) pueden migrar de los materiales de envasados a los alimentos, con la capacidad de potencial de aumentar los problemas de seguridad y/o calidad (Man, 2002).

2.3.3 Cambios químicos y/o bioquímicos

Los alimentos están compuestos por productos químicos y la mayoría de las materias primas utilizadas en la elaboración de los productos alimenticios son de origen biológico. Por eso, es inevitable que ocurran ciertos cambios químicos o bioquímicos. Con la excepción de algunos pocos cambios, como el curado de quesos y la maduración de las frutas después de su recolección, la mayoría de los cambios químicos y bioquímicos que ocurren en los alimentos son indeseables y por lo tanto afectan su vida útil. Los cambios químicos y bioquímicos más importantes son la oxidación, hidrolisis, pardeamiento no enzimático, pardeamiento enzimático y las interacciones entre el alimento y su envase (Man, 2002).

- **Oxidación**

La oxidación se puede llevar a cabo en productos como grasas, aceites, pigmentos alimentarios y vitaminas. La oxidación de las grasas y los aceites provoca el desarrollo de olores y aromas no deseables (rancio) en los alimentos y debido a ello el rechazo o

menor aceptación por parte de los consumidores. La rancidez oxidativa, a veces denominada autooxidación, es una reacción química con una baja energía de activación y por lo tanto no se detiene bajando las temperaturas de almacenamiento del alimento. Puede tener lugar mediante dos mecanismos: el mecanismo clásico que implica radicales libres y precisa de un catalizador o el mecanismo de fotooxidación en presencia de un agente sensibilizante. La oxidación rancia disminuye la calidad nutritiva del alimento, debido a que los radicales libres y los peróxidos generados destruyen en los alimentos los ácidos grasos poliinsaturados y las vitaminas liposolubles. Todos los pigmentos alimenticios son inestables. Las variaciones en el color hacen que el alimento sea más o menos aceptable. La oxidación de ciertos pigmentos causa cambios de color en los alimentos y por lo tanto, pueden causar un rechazo del producto. Las vitaminas son uno de los pocos componentes de los alimentos en los que es posible demostrar cuantitativamente una reducción del contenido de las mismas durante un periodo de tiempo. Las vitaminas son sensibles al oxígeno (Man, 2002).

▪ **Hidrólisis**

La hidrólisis consiste en la división de las moléculas, en condiciones adecuadas, en presencia de agua. En algunos alimentos las reacciones hidrolíticas pueden afectar la vida útil. Tal es el caso de la hidrólisis de grasas y aceites. La hidrólisis de los triglicéridos en presencia de humedad y una enzima, libera ácidos grasos de cadena corta que tienen olores desagradables (Rancidez). La enzima habitualmente implicada es una lipasa o estearasa libre (Man, 2002).

▪ **Pardeamiento no enzimático**

Las reacciones de Maillard es un mecanismo de pardeamiento no enzimático bien conocido. Implica la reacción de un aldehído (habitualmente un azúcar reductor) y una amina (una proteína o aminoácido). El ritmo de las reacciones aumenta con la temperatura, el tiempo del tratamiento térmico y las aminas libres y grupos aldehídos. La reacción también se ve facilitada en condiciones alcalinas y aumentada por los fosfatos. Se caracteriza por un pardeamiento acompañado de una pérdida de valores nutritivos, especialmente por pérdidas de lisinas que es un aminoácido esencial que reacciona rápidamente con los azúcares reductores (Man, 2002).

- **Pardeamiento enzimático**

El pardeamiento enzimático es causado por la oxidación enzimática de los compuestos fenólicos (el sustrato) iniciada por la enzima polifenoloxidasas también se conoce como fenolasa. Los factores más importantes que afectan la velocidad del pardeamiento de frutas y vegetales son las concentraciones tanto de la fenolasa activa y de los compuestos fenólicos, el pH, la temperatura y la disponibilidad de oxígeno en el tejido (Man, 2002).

2.3.4 Cambios inducidos por la luz

En los cambios inducidos por la luz los factores más importantes son: la longitud de onda de la luz (UV o visible), la intensidad, la duración de la exposición, la presencia de agentes sensibilizantes, la temperatura ambiental y la cantidad de oxígeno disponible (Man, 2002).

La descomposición de las vitaminas aumenta con el aumento de la intensidad de la luz siempre que haya oxígeno. La oxidación de la leche inducida por la luz, puede producir olores extraños parecidos a los del cartón y causado por la oxidación de la grasa láctea. La luz acelera la rancidez oxidativa de los alimentos. A los alimentos se les añade color por razones de presentación, principalmente. Muchos colorantes naturales (riboflavina) o derivados de los naturales (curcumina y clorofila) son sensibles a la luz, perdiendo intensidad. Su escasa estabilidad limita su uso en productos congelados o con corta vida útil (Man, 2002).

2.3.5 Cambios microbiológicos

Todos los alimentos, especialmente los que tienen más humedad, son sustratos ideales para el crecimiento bacteriano, el cual, si es permitido, será causa de intoxicaciones alimentarias o deterioro del alimento. Los factores que afectan el crecimiento microbiológico son (Man, 2002):

- Las propiedades intrínsecas del alimento, es decir, nutrientes, pH, acidez total, actividad de agua, estructura, presencia de conservantes y/o antimicrobianos naturales, potencial redox.

- Los factores extrínsecos, como la temperatura ambiental, humedad relativa, atmósferas gaseosas.
- Los factores derivados de la elaboración, como tratamientos térmicos, congelación, envasado.
- Los factores implícitos, como las características fisiológicas, velocidad de crecimiento del microorganismo y las interacciones microbianas.

2.4 Procesos de conservación aplicados en alimentos

Con fin de reducir la presencia de agentes microbianos que deterioran los alimentos y reducen su vida útil, en los procesos de elaboración de alimentos se utilizan mayoritariamente los siguientes procesos de conservación:

2.4.1 Tratamientos térmicos

Los tratamientos térmicos en alimentos se utilizan principalmente para inactivar microorganismos patógenos o de descomposición, inactivar enzimas (polifenol oxidasa o lipasas). Sin embargo, la resistencia al calor puede variar entre los diferentes microorganismos; esta diferencia puede expresarse a través del concepto de muerte térmica. El punto de muerte térmica es la temperatura más baja necesaria para causar la muerte a todas las bacterias en una suspensión líquida particular en 10 min. Otro factor que se debe considerar en la esterilización es el tiempo requerido, que se expresa como tiempo de muerte térmica, que es el tiempo necesario para que todas las bacterias de un cultivo líquido mueran a una temperatura determinada (Tortora *et al.*, 2007). Sin embargo, el calentamiento de un alimento puede ocasionar cambios físicos y reacciones químicas, tales como gelatinización del almidón, desnaturalización de las proteínas que a su vez afecta las características sensoriales, como el color, el sabor, y la textura. Los procesos térmicos varían mucho de acuerdo a su intensidad, van desde procesos de termización y pasteurización hasta procesos más fuertes como la esterilización. De acuerdo al tratamiento térmico utilizado en el alimento puede variar la vida útil y otras características de calidad (Lewis, 2006).

▪ Cinética de reacción

Todos los procesos térmicos involucran tres períodos distintos: un período de calentamiento, uno de mantenimiento y un período de enfriamiento. En teoría, los tres períodos pueden contribuir a que se lleven a cabo reacciones, aunque en situaciones donde la calefacción y la refrigeración son rápidas, el período de tenencia es el más significativo. Sin embargo, para determinar el efecto global del tratamiento térmico, se necesitan procedimientos para evaluar cada uno de estos períodos de forma individual. Por lo tanto, el más fácil de tratar es el período de tenencia, ya que se lleva a cabo a una temperatura constante. Entonces es necesario determinar el efecto de los cambios en la temperatura durante el calentamiento y el enfriamiento en las velocidades de reacción. Es decir, la inactivación microbiana se mide primero a temperatura constante (Lewis, 2006).

Cuando se llevan a cabo estudios de la inactivación por calor a temperatura constante, a menudo se observa que la inactivación microbiana sigue una reacción cinética de primer orden, es decir, la tasa de inactivación es directamente proporcional a la población. La resistencia al calor de un organismo se caracteriza por su reducción decimal tiempo (D_T), que se define como el tiempo requerido para reducir la población en un 90% o en un orden de magnitud, es decir, 10^4 a 10^3 , a una temperatura constante, T . Cada microorganismo tiene su propia característica de resistencia al calor y con un mayor valor D , mayor es su resistencia al calor. La resistencia al calor también se ve afectada por otros factores, tales como pH, actividad de agua y la presencia de otros solutos, tales como azúcares y sales (Lewis, 2006).

▪ Dependencia de la temperatura

La mayoría de procesos no se llevan a cabo a temperatura constante, sino que involucran periodos de calefacción y de refrigeración. Por lo tanto, aunque es fácil de evaluar el efecto del periodo de mantenimiento de la resistencia al calor y la letalidad, es importante apreciar que la calefacción y la refrigeración también pueden contribuir a la letalidad total de microorganismos. En alimentos se utilizan un parámetro conocido como el valor de z , para describir la dependencia de la temperatura. Esto se basa en que a un rango de temperaturas definido, existe una relación lineal entre el logaritmo del tiempo de reducción decimal y la temperatura. Un bajo valor z implica que la reacción es muy sensible a la temperatura. En general, la inactivación microbiana es muy sensible a la

temperatura, siendo las formas vegetativas más sensibles al calor que los microorganismos esporulados.

El Q_{10} es otro parámetro utilizado para medir la dependencia de la temperatura. Se define como la relación de velocidad de reacción a $T + 10$ (Lewis, 2006).

2.4.2 Conservantes

Los conservantes es un grupo importante de aditivos cuya finalidad es prevenir el crecimiento microbiano de hongos, levaduras y bacterias. La efectividad de los conservantes depende de factores como: especificidad de acción, composición del alimento (el pH, la fuerza iónica, la actividad acuosa, la disponibilidad de nutrientes para los microorganismos), el nivel inicial de la contaminación (los productos altamente contaminados no pueden controlarse con la adicción normal de estos aditivos) y el manejo y distribución del producto terminado.

2.5 Procesos de conservación aplicados a miel de abejas

La miel de abejas puede adquirir contaminantes biológicos, químicos y físicos en el transcurso de la producción por factores ambientales, inadecuada manipulación y almacenamiento. Por lo tanto, se debe tratar térmicamente principalmente para eliminar la contaminación biológica de microorganismos y retrasar la aparición de cristales de monosacáridos. La cristalización conduce a la separación de fases y al mismo tiempo, la actividad de agua de la fase líquida comienza a aumentar. Como consecuencia de la liberación de agua y la posterior disminución de la concentración de hidratos de carbono en la fase líquida. Este fenómeno hace a la miel una matriz adecuada para el crecimiento de microorganismos como mohos y levaduras que conducen a la modificación de las propiedades sensoriales y daños de calidad del producto.

2.5.1 Calentamiento

El calentamiento es un proceso suave que está diseñado para aumentar el tiempo de conservación de los alimentos, especialmente de la leche cruda. Se utiliza para reducir las cargas microbianas e inactivar algunas enzimas como la proteasas y lipasas.

Usualmente se utilizan temperaturas de 58 a 68 °C durante 15 s. Generalmente, la terminación es un tratamiento preliminar por lo que es necesario emplear posteriormente un nuevo tratamiento más severo (Lewis, 2006).

2.5.2 Pasterización

Un proceso llamado así en honor al científico Louis Pasteur, y es aplicado a un producto mediante una adecuada relación de temperatura y tiempo para destruir su flora patógena y casi la totalidad de su flora banal, sin alterar de manera esencial ni su valor nutritivo, ni sus características fisicoquímicas u organolépticas (ICONTEC, 2002). Sin embargo, los tiempos y temperaturas de la pasterización varían de acuerdo a la composición de los alimentos. Pues el calentamiento es menos eficaz en los alimentos que son más viscosos y la presencia de grasa puede tener un efecto protector sobre los microorganismos. La pasterización por considerar combinaciones de tiempo y temperatura para su aplicación, también puede ilustrarse en el concepto de tratamientos equivalentes, pues a medida que se aumenta la temperatura se necesita mucho menos tiempo para eliminar el mismo número de microorganismos (Tortola *et al.*, 2007)

En la miel, la pasterización permite controlar los procesos de cristalización y destruye las levaduras presentes. La temperatura de pasterización recomendada es de 62,8 °C durante 30 min. El calentamiento debe realizarse lo más rápidamente posible y una vez alcanzado el tiempo de proceso debe enfriarse inmediatamente (White, 1980).

2.5.3 Tindalización

La tindalización consiste en calentar los productos de 80 a 100 °C durante cierto tiempo por ciclos consecutivos. Entre cada etapa de calentamiento se incuba a 37°C en anaerobiosis. En las etapas de calentamiento se destruyen los microorganismos, pero permanecen las esporas, las cuales germinan en las etapas de incubación, para que nuevamente se destruyan los microorganismos en la segunda o tercera etapa de calentamiento (Romero, 2007). Sin embargo, se puede presentar un problema con el crecimiento de bacterias cuando la temperatura o el tiempo del tratamiento no son suficientes para destruir las formas viables (Thiel, 1999).

Aunque este tratamiento de tindalización es poco utilizado en la industria de alimentos por el tiempo que requiere para su ejecución, ha sido ampliamente utilizado en la industria farmacéutica y en la medicina. Se ha utilizado para esterilizar implementos quirúrgicos susceptibles a altas contaminaciones microbianas, pero que no resisten procesos de esterilización mayores a 100 °C, esterilización de sueros sanguíneos, soluciones inyectables y sustancias antibióticas (Romero & Fernández, 2011). Y sigue siendo un método eficiente en el control de esporas, especialmente esporas de *Clostridium ssp.* (Gould, 2006).

2.5.4 Maduración

Es el proceso físico llevado a cabo por un proceso simple de decantación, por el que dos o más sustancias no miscibles, al menos una de ellas líquida, se separan por diferencia de densidades. Las partículas de cera y las burbujas de aire tienen la tendencia a llegar rápidamente a la superficie. La rapidez del proceso de ascensión depende de las características físicas de estas cargas: peso, tamaño y forma, principalmente, así como viscosidad de la miel, temperatura de la sala de extracción y de la forma y altura de los recipientes en los que se almacena (Piana *et al.*, 1989)

En los clásicos bidones en los que se almacena la miel puede producirse este proceso de forma espontánea, pero al ser contenedores muy estrechos o altos, la decantación puede interrumpirse por una pérdida de fluidez o por la cristalización que puede iniciarse en el producto. En salas de extracción mecanizadas se utilizan bancos de decantación que tienen paredes atemperadas mediante resistencias eléctricas o sistemas análogos, que permite que el proceso se haga en continuo solventando los problemas reseñados anteriormente (Salvachúa *et al.*, 2005).

Los madurados suelen ser recipientes de acero inoxidable o bien suelen estar estados o cubiertos interiormente por una pintura alimentaria. Durante su estancia en el madurador, la miel que es muy higroscópica no debe absorber la humedad del aire. El madurador estará tapado y la miel no permanecerá más tiempo necesario para permitir su decantación (2 a 8 días en general) y en el caso de mieles muy viscosas (espliego) resulta indicado un calentamiento a 40 °C antes de una decantación de 48 horas en un madurador con calentador. Hay que señalar que en la fase de maduración de la miel

pierde humedad y tienen lugar cambios físico-químicos y biológicos que afectan a su composición.

2.5.5 Deshumidificación

Es la operación unitaria que consiste en la separación del vapor de agua de una mezcla líquida con la ayuda de aire puro. Existen diferentes procesos para remover la humedad estos son: por enfriamiento, hasta alcanzar una temperatura por debajo del punto de rocío, por el incremento de la presión total, lo cual causa la condensación (Filtramex, 2012). En ausencia de agua, los microorganismos no pueden crecer ni reproducirse pero pueden permanecer viables por muchos años. La resistencia de las células vegetativas a la desecación varía según la especie y el ambiente que rodea al microorganismo (Tortora et al., 2007).

2.5.6 Ultrasonido

Los ultrasonidos pueden definirse como ondas acústicas inaudibles de una frecuencia superior a 20 kHz. Para la conservación de los alimentos, son más eficaces las ondas ultrasónicas de baja frecuencia (18-100 kHz; $\lambda=145\text{mm}$) y alta intensidad (10-1000 W/cm²). El efecto conservador de los ultrasonidos está asociado a los fenómenos complejos de cavitación gaseosa, que explican la generación y evolución de microburbujas en un medio líquido. La cavitación se produce en aquellas regiones de un líquido que se encuentran sometidas a presiones de alta amplitud que alternan rápidamente. Durante la mitad negativa del ciclo de presión, el líquido se encuentra sometido a un esfuerzo tensional y durante la mitad positiva del ciclo experimenta una compresión. El resultado es la formación ininterrumpida de microburbujas cuyo tamaño aumenta miles de veces (se expanden) en la alternancia de los ciclos de presión. Las microburbujas que alcanzan un tamaño crítico implosionan o colapsan violentamente para volver al tamaño original. La implosión supone la liberación de toda la energía acumulada, ocasionando incrementos de temperatura instantáneos y focales, que se disipan sin que supongan una elevación sustancial de la temperatura del líquido tratado. Sin embargo, la energía liberada, así como el choque mecánico asociadas al fenómeno de implosión, afectan la estructura de las células situadas en el microentorno (Herrero & Romero, 2006).

2.5.7 Altas presiones hidrostáticas

La aplicación de alta presión hidrostática se basa en someter a un producto a elevados niveles de presión hidrostática (100-1000 MPa) de forma continua durante un cierto tiempo. A este tipo de tecnología se la denomina comúnmente altas presiones hidrostáticas (High Pressure Processing, HPP) (Herrero & Romero, 2006). No obstante, la alta presión aplicada a suspensiones líquidas se transfiere de modo instantáneo y uniforme a través de la muestra. Si la presión es lo suficientemente elevada se alteran las estructuras moleculares de las proteínas y los carbohidratos, lo que da como resultado la inactivación rápida de formas vegetativas de las bacterias. Las esporas son relativamente resistentes a la alta presión. Sin embargo, pueden ser destruidas por otras técnicas, como por ejemplo la combinación de la alta presión con temperaturas elevadas o por ciclos de presión alternantes, que produzcan germinación de las esporas, seguido por la muerte causada por la presión de las células vegetativas resultantes (Tortora *et al.*, 2007).

2.6 Vida útil de los alimentos

La vida útil es un período en que un alimento mantiene las características físicas, químicas, nutricionales, sensoriales, microbiológicas y de seguridad aceptable para el consumidor, almacenando bajo condiciones óptimas preestablecidas. En el instante en que alguna de las características mencionadas se considera como inaceptable el producto ha llegado al fin de su vida útil (Anzueto, 2012).

Desde el punto de vista de la industria alimentaria la vida útil está basada en la proporción de pérdida de calidad que se permitirá antes del consumo del producto. Para los consumidores, el extremo de vida útil es el tiempo cuando el producto absolutamente ya no tiene un sabor aceptable. Para la alta calidad del arte culinario, esto significa un cambio muy pequeño que puede tener lugar, cuando los consumidores quieren una calidad igual a “gusto a fresco” o “como recién preparado” (Morales *et al.*, 2009).

Desde el punto de vista sensorial la vida útil de un alimento se puede definir como el tiempo que transcurre entre la producción/envasado del producto y el punto en el cual se vuelve inaceptable bajo determinadas condiciones ambientales. La finalización de la vida útil de alimentos puede deberse a que el consumo implique un riesgo para la salud del

consumidor, o porque las propiedades sensoriales se han deteriorado hasta hacer que el alimento sea rechazado. En este último caso la evaluación sensorial es el principal método de evaluación, ya que no existen métodos instrumentales o químicos que reemplacen adecuadamente a nuestros sentidos (Morales *et al.*, 2009).

Desde el punto de vista de la producción de un nuevo producto, el conocimiento de la vida útil es un aspecto muy importante. Esta vida debe al menos exceder el tiempo mínimo requerido de distribución del productor al consumidor. La determinación oportuna y objetiva de la "vida útil" de sus productos le permitirá a los empresarios evitar pérdidas por devolución, ampliar su mercado nacional y de exportación y ganar la confianza del consumidor (Morales *et al.*, 2009).

2.6.1 Factores que influyen en la vida útil de los alimento

Existe una relación directa entre los factores que influyen la vida útil de los alimentos y los mecanismos por los que se deterioran. Hay muchos factores que pueden influir en la vida útil, y se pueden clasificar en intrínsecos y factores extrínsecos (Morales *et al.*, 2009).

Los factores intrínsecos son las propiedades de la final producto y están influenciados por variables tales como el tipo de materia prima y calidad, y la formulación del producto y la estructura. Estos incluyen la actividad de agua (a_w), el valor de pH y acidez total, potencial redox, oxígeno disponible, los nutrientes, microflora natural y sobrevivir recuentos microbiológicos, bioquímica natural de la formulación del producto (enzimas, químicas reactivos), el uso de conservantes en la formulación del producto (Morales *et al.*, 2009).

Los factores extrínsecos son aquellos factores el producto final se encuentra con que se mueve a través de la cadena alimentaria. Incluyen los siguientes: Perfil de tiempo-temperatura durante el proceso; presión en el espacio de cabeza, control de la temperatura durante el almacenamiento y la distribución, la humedad relativa (RH) durante el procesamiento, almacenamiento y distribución, la exposición a la luz (UV e IR) durante el procesamiento, almacenamiento y distribución, almacenamiento y distribución, composición de la atmósfera dentro de un envase, el tratamiento térmico posterior, manejo del consumidor (Morales *et al.*, 2009).

Un tipo particularmente útil de la interacción se produce entre los factores intrínsecos y extrínsecos operan en concierto para restringir el crecimiento microbiano es el llamado "efecto barrera". Esta forma de factores que, individualmente, no pueden prevenir el crecimiento microbiano combinando pero, en combinación, proporcionan una serie de obstáculos que lo hacen, permite los fabricantes utilizar técnicas de procesamiento más suaves que conservan más de un propiedades sensoriales y nutricionales del producto (Morales *et al.*, 2009).

La interacción de factores intrínsecos y extrínsecos tales como éstos, inhibe o estimula una serie de procesos que limitan la vida útil. Estos procesos pueden ser convenientemente clasificados como: microbiológica, química, física y temperatura (Morales *et al.*, 2009).

2.6.2 Determinación de la vida útil de los alimentos

El primer paso en el desarrollo de un estudio de vida útil de un alimento es conocer el mecanismo por el cual se deteriora. El modo en que los alimentos se deterioran y la duración de su vida útil están influenciados por los factores explicados en el ítem 2.6.1. Estos factores que influyen en la vida útil son las propiedades del producto final y del medio ambiente en el que se elaboró, almacenó, distribuyó y utilizó (Man, 2002).

La manera habitual y directa de establecer la vida útil de un producto, es realizar pruebas de almacenamiento del producto en condiciones similares en las que probablemente se den, durante el almacenamiento, distribución, exposición para la venta y uso por el consumidor. Pero esta metodología no es muy aceptable si la vida útil prevista es muy larga. Para este caso, se pueden utilizar las pruebas de almacenamiento acelerada (Man, 2002).

▪ Almacenamiento en condiciones aceleradas

La determinación rápida de la vida útil (pruebas aceleradas) se utiliza para disminuir el tiempo necesario para estimar la vida útil, que de otro modo sería muy largo. El uso de estas pruebas se hace más importante cuando la vida útil se prevé que va ser larga, de meses a varios años. El efecto de la temperatura sobre la calidad de los alimentos ha sido ampliamente estudiado, por lo que se dice que al aumentar la temperatura se

aceleran algunas reacciones químicas y estas conllevan cambios negativos en el almacenamiento. Por lo tanto, la forma más común de realizar la determinación rápida de la vida útil de los alimentos es consiste en almacenar el producto a temperaturas elevadas. Se asume que almacenando el producto a temperaturas más alta, cualquier efecto adverso que tenga lugar en el almacenamiento y por tanto afecte la vida útil podrá ser observado en un periodo de tiempo menor, pudiendo estimarse la caducidad en condiciones normales de almacenamiento por extrapolación de los datos obtenidos en la determinación rápida (Man, 2002).

▪ **Características del almacenamiento**

Las características del almacenamiento pueden ser fijas o variables. Las condiciones de almacenamiento reales dependerán del producto investigando y del conocimiento que tenga el investigador sobre la cadena de distribución prevista hasta llegar al consumidor y ser utilizado. En condiciones ideales, para cada grupo de características del almacenamiento, deben estar disponibles las siguientes variaciones (Man, 2002):

Condiciones óptimas: Son las condiciones de almacenamiento, temperatura, humedad, luz y demás más favorables. El almacenamiento en estas condiciones proporcionará datos para establecer la vida útil de los alimentos más adecuada (Man, 2002).

Condiciones medias o típicas: son las condiciones de almacenamiento del producto más habituales. El almacenamiento en estas condiciones proporcionará datos para establecer la vida útil para la mayoría de las producciones, durante la mayor parte del tiempo (Man, 2002).

Peores condiciones posibles: son las condiciones más extremas en las que probablemente se encuentre el producto. El almacenamiento en estas condiciones debe dar datos para establecer la caducidad más conservadora (Man, 2002).

Las condiciones de almacenamiento que se usan habitualmente son:

- a. Productos congelados: -18°C o inferior. La humedad relativa habitualmente cercana al 100%
- b. Productos refrigerados: De 0 a $+5^{\circ}\text{C}$, con máximo de $+8^{\circ}\text{C}$, la humedad relativa suele ser muy alta.

- c. Clima templado: A 25 °C y 75 % de humedad relativa.
- d. Tropical: A 38 °C y 90% de humedad relativa.
- e. Control: las condiciones controladas, para muestras de control del almacenamiento, suelen ser las condiciones óptimas, ya sean a temperatura ambiente, refrigeración o congelación.

▪ **Muestreos de las pruebas de almacenamiento**

Se debe elegir cuidadosamente el número y el tamaño de las muestras, proporcionales a los objetivos a los objetivos de las pruebas de almacenamiento. Preferiblemente, el alimento se debe almacenar en el mismo empaque o envase en el que se vaya a utilizar cuando se realice la producción a gran escala. El número de muestras a tomar se fija de acuerdo a la frecuencia de muestreo de las pruebas de almacenamiento. A su vez, la frecuencia de muestreo se ve afectada por el tipo de producto, el uso esperado, la vida útil esperada y las pruebas a realizar para evaluar sus cambios durante el almacenamiento (Man, 2002).

▪ **Frecuencia de muestreo**

La frecuencia de muestreo se elige de acuerdo a la vida útil esperada por el investigador o la que quiere el cliente. Por lo que se han definido algunos ejemplos de frecuencia de muestreo (Man, 2002):

- a. Productos de corta vida útil. En el caso de productos refrigerados con una vida útil hasta de una semana se tomaran muestras diariamente para su análisis.
- b. Productos de vida útil media. Para productos con una caducidad de hasta tres semanas se tomaran en los días 0, 7, 14, 19, 21, 25.
- c. Productos de caducidad larga. En el caso de productos con una caducidad hasta de un año se toman muestras mensuales o en los meses 0, 1, 2, 3, 6, 12. La frecuencia exacta dependerá del producto y de lo que se conoce de su comportamiento durante su almacenamiento.

▪ **Parámetros para determinar la vida útil**

Las pruebas de vida útil son específicas para cada producto y pueden ser de tipo fisicoquímico, microbiológico y análisis sensorial. Las pruebas sensoriales es quizás la más apropiada para evaluar los cambios durante las pruebas de almacenamiento (Man, 2002).

2.6.3 Modelamiento de las variables de respuesta de los estudios de vida útil

Es posible expresar el comportamiento de las variables de respuesta de los estudios de vida útil a través de modelos matemáticos. Con fin de que estos modelos sirvan como herramienta de predicción del tiempo de vida útil de ese mismo producto solo conociendo los valores iniciales de cada una de las variables de la función matemática. Dependiendo el tipo de pruebas que se realice durante el almacenamiento se pueden utilizar diferentes tipos de modelos.

▪ **Modelos predictivos basados en la cinética química**

La velocidad de deterioro de la calidad fisicoquímico de los alimentos procesados se puede describir con la ecuación 2.1 (Palazón *et al.*, 2009):

$$\pm \frac{dQ}{dt} = k_q \cdot [Q]^n \quad (2.1)$$

Dónde: Q es la característica de calidad; t es el tiempo; n= orden de reacción; k_q es la constante de velocidad de deterioro de la calidad. El signo (+) se refiere a características de valores crecientes con el tiempo (aroma y color) y el signo (-) a características con valores decrecientes (apariencia general).

La mayoría de las reacciones que han sido estudiadas en cuanto al deterioro de alimentos, se caracterizan por tener una cinética de orden cero, uno ó dos (Piergiovanni & Limbo, 2010, Salinas-Hernández *et al.*, 2007).

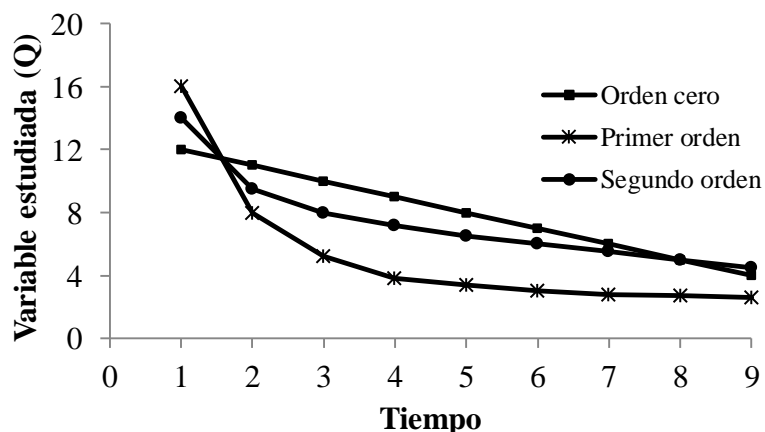
$$Q = Q_0 - kt_{s1} \quad \text{Orden cero} \quad (2.2)$$

$$\ln \frac{Q}{Q_0} = -kt_{s1} \quad \text{Primer orden} \quad (2.3)$$

$$\frac{1}{Q_0} = \frac{1}{Q} + kt_{sl} \quad \text{Segundo orden} \quad (2.4)$$

Donde Q_0 = valor inicial del parámetro de calidad; Q = Valor de la característica en el tiempo t ; k = constante aparente de la reacción; t_{sl} = tiempo de vida útil. Para poder definir el orden de la reacción es necesario realizar una regresión lineal utilizando de los valores de los parámetros de calidad que se está estudiando contra el tiempo de almacenamiento. Para reacciones de orden cero se grafica Q vs t , de orden uno se grafica $\ln(Q)$ vs t y para segundo orden se grafica $1/Q$ vs t , y se evalúa los coeficientes de correlación (r^2) de la gráfica. Se elige la gráfica con el mayor coeficiente de correlación.

Figura 2-5: Representación gráfica del comportamiento de los datos de la variable de calidad acuerdo al orden de reacción cinética



Cuando se realizan estudios de vida útil a diferentes temperaturas, es posible relacionar la velocidad de una reacción química con el aumento de temperatura. La relación entre la constante de la velocidad k y temperatura fue inicialmente propuesta por Arrhenius:

$$k = Ae\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (2.5)$$

La constante A se llama factor de frecuencia o factor pre-exponencial; E_a es la energía de activación; R es la constante universal de los gases ($0.001987 \text{ kcal. mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) y T es la temperatura absoluta en Kelvin.

En teoría, cuando se representa el $\ln(k)$ con el inverso de la temperatura absoluta se obtiene una línea recta, siendo su inclinación la energía de activación dividida por la

constante de los gases (E_a/R). Las gráficas de k con $1/T$ se llaman graficas de Arrhenius. Otro parámetro que se utiliza para describir la relación entre la temperatura y la velocidad de reacción es el factor Q_{10} que se define como:

$$Q_{10} = \frac{\text{Velocidad a } (T+10)^{\circ}\text{C}}{\text{Velocidad a } T^{\circ}\text{C}} = \frac{\text{vida útil a } T^{\circ}\text{C}}{\text{vida útil a } (T+10)^{\circ}\text{C}} \quad (2.6)$$

▪ Modelos predictivos del crecimiento microbiano

El deterioro de alimentos por acción microbiana ha sido descrito mediante modelos primarios y secundarios. Los primarios expresan la curva de crecimiento microbiano respecto al tiempo, mientras que los secundarios consideran además el efecto de las diferentes condiciones ambientales sobre los parámetros del crecimiento microbiano (Salinas-Hernández *et al.*, 2007).

Los modelos propuestos, ya sean primarios o secundarios, pueden ser de tipo empírico o de tipo mecanístico. Los primeros son ecuaciones que expresan el comportamiento de los datos experimentales y por lo tanto, describen el crecimiento microbiano; los de tipo mecanístico tienen además la ventaja de ser útiles para condiciones diferentes a aquellas para las que fueron desarrollados. Los modelos lineales de tipo primario pueden ser representados de manera general por el modelo Monod, que es un modelo de tipo mecanístico. En cambio, el modelo no lineal más utilizado es la ecuación de Gompertz (Salinas-Hernández *et al.*, 2007).

Para los modelos secundarios se han propuesto diferentes ecuaciones para expresar el crecimiento microbiano en función de la temperatura. Sin embargo, pocos modelos son aplicables para predecir la vida de anaquel del producto debido al número de parámetros considerados en el modelo. Los modelos más utilizados son el de Arrhenius y el de la raíz cuadrada.

Modelo de Gompertz: Este modelo permite predecir la velocidad de crecimiento de los microorganismos durante el tiempo de almacenamiento.

$$N = \log N_0 + C^{(-C^{(-b(t-m))})} \quad (2.7)$$

En donde N = población de microorganismos al tiempo t (UFC/g); N_0 = población inicial (UFC/g); t = tiempo (h); c = valor asintótico del crecimiento que ocurre cuando t aumenta indefinidamente (log UFC/g); b = velocidad máxima de crecimiento relativa a tiempo m (h^{-1}); m = tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento (h).

Modelo de la raíz cuadrada: El modelo de la raíz cuadrada es una ecuación que describe la dependencia del crecimiento microbiano respecto a la temperatura, en condiciones por arriba de la temperatura óptima para el crecimiento microbiano. Este modelo considera dos parámetros para determinar la raíz cuadrada de la tasa de crecimiento a partir de la curva de crecimiento, ecuación 2.8.

$$\sqrt{k} = b(T - T_{min}) \quad (2.8)$$

En donde: k = tasa de crecimiento específica obtenida de la curva de crecimiento; b = pendiente de la línea de regresión debajo de la temperatura óptima; T = temperatura ($^{\circ}\text{C}$); T_{min} = temperatura correspondiente al mínimo crecimiento.

▪ Modelos predictivos del deterioro sensorial

Existen varios modelos basados en probabilidad de aceptación de los productos que pueden ser utilizados para modelar la vida útil de un alimento, entre ellos los siguientes:

Distribución de probabilidad de Weibull: Este modelo se construye a partir de una curva de riesgo en la cual se toma el criterio de falla en la prueba sensorial para el cual el alimento se rechaza (García *et al.*, 2010). Para cada valor observado se toma el tiempo y se marcan aquellos valores para los cuales el producto falla. Se anota el orden del suceso en el que se suministra el tiempo, tanto para las muestras que fallan, como para las que no fallan. Este proceso genera una serie de observaciones ordenadas, luego se invierte el orden del suceso y se obtiene el rango inverso, denominado 'K'. Los valores de riesgo $h(t)$ para las muestras que fallan se calculan mediante la ecuación 2.9 (Salinas-Hernández *et al.*, 2007):

$$h(t) = \frac{100}{k} \quad (2.9)$$

Para cada tiempo de falla se calcula el riesgo acumulado $h(t)$ sumando al riesgo actual el valor precedente. Con estos datos y teniendo en cuenta que la función de probabilidad acumulada para la distribución de Weibull, se expresa como:

$$F(t) = 1 - e^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta} \quad (2.10)$$

Donde, α es el parámetro de escala y β es el parámetro de forma, $F(t)$ es la función de probabilidad acumulada, y t es el tiempo de evaluación.

Se ajustó a un modelo de regresión lineal para determinar los parámetros de la distribución de Weibull, a partir de los cuales se establece el tiempo medio de almacenamiento en el cual el consumidor rechazaría el producto:

$$E(t) = \alpha x \Gamma \left[1 + \frac{1}{\beta} \right] \quad (2.11)$$

Donde, $E(t)$ es el valor esperado de vida útil y Γ es la función Gamma.

2.7 Antecedentes

A continuación se relacionan varios trabajos de investigación en miel de *A. mellifera* y *T. angustula* sobre el efecto que tienen los tratamientos térmicos y el almacenamiento sobre los parámetros de calidad.

2.7.1 Efecto de los tratamientos térmicos sobre los parámetros de calidad de la miel de abejas de *A. mellifera*

La reducción de la vida útil de la miel la proliferación de microorganismos y la presencia de cristales de monosacáridos son los problemas por los cuales se necesita emplear tratamientos térmicos para el procesamiento de la miel (Kowalsk *et al.*, 2012). Sin embargo, el procesamiento térmico de la miel también puede resultar en deterioro de la calidad fisicoquímica del producto. El calentamiento puede llevar a niveles no permitidos por la normatividad de los parámetros como el contenido de HMF y la actividad

enzimática (Moreira *et al.*, 2007 y Subramanian *et al.*, 2007). La alternativa más común para frenar la pérdida de calidad de la miel es el almacenamiento a bajas temperaturas (Gonçalves, 2006). Sin embargo, es importante conocer el comportamiento de cada miel cuando sometida a esta condición puesto que la pérdida de calidad se retarda, pero el proceso de cristalización se puede acelerar y para revertir este proceso indeseable en la miel es necesario emplear tratamientos térmicos.

A continuación se presentan algunos de los efectos del calentamiento sobre las propiedades específicas de la miel de abejas.

▪ **Efecto de los tratamientos térmicos sobre la actividad diastasa**

La actividad de ésta enzima disminuyen con el calentamiento y el tiempo de almacenamiento de la miel. Por lo que se ha encontrado una reducción de esta enzima, al tratar la miel a 50 °C, 70 °C y 90 °C por 120 min (Brudzynski & Kim 2011) y tratamientos de 50 °C y 70 °C (Samborska & Czelejewska, 2012). Igualmente, ocurrió en mieles multiflorales tratadas a 50 °C por 2 h y a 80 °C por 2-3 h (Rotarescu & Vidican, 2010) y tratamientos de 55 y 65°C en intervalos de tiempo de 6 - 30 min (Sahinler & Gul, 2005).

▪ **Efecto de los tratamientos térmicos sobre la formación de HMF**

Este compuesto se incrementa cuando la miel se somete a altas temperaturas por intervalos de tiempo cortos o temperaturas inferiores a 70 °C por largo tiempo (Díaz, 2009, Gonçalves, 2006, Sahinler & Gul, 2005 y Rotarescu & Vidican, 2010). O cuando la miel es sometida a secado por pulverización (Samborska & Czelejewska, 2012). Aunque se ha encontrado que la formación de HMF en las mieles está relacionado con el origen floral (Turhan *et al.*, 2008), el pH (Díaz, 2009 y Zhang *et al.*, 2012) y la acidez de la miel, las reacciones de Maillard y la intensidad de la luz de los lugares de almacenamiento (Boonchiangma *et al.*, 2011 y Díaz, 2009), siendo las reacciones de Maillard las que mayor incidencia tiene (Boonchiangma *et al.*, 2011) y finalmente por el material del envase (Díaz, 2009).

- **Efecto de los tratamientos térmicos sobre otras características fisicoquímicas de la miel de *A. mellifera***

En la miel ocurren muchos cambios en las propiedades sensoriales y de composición durante los tratamientos térmicos y almacenamiento. Estas variaciones están asociadas a las reacciones de caramelización y de Maillard catalizadas por acción del calor y el origen botánico del néctar (Moreira *et al.*, 2007, Gonçalves 2006, Baroni *et al.*, 2006, Castro-Vázquez *et al.*, 2009 y Escriche *et al.*, 2009). Los aldehídos, cetonas, ésteres, alcoholes, hidrocarburos y compuestos de azufre son los grupos de sustancias volátiles comunes que sean detectados e identificados en miel. El cambio en el aroma es una característica de la miel muy estudiada pues ésta, es un atributo muy importante para la caracterización de la miel, identificación de fuentes florales y regionales (Bianchi *et al.*, 2005) y control de calidad (Moreira *et al.*, 2007) y están relacionados con el tipo de tratamiento térmico. Se han encontrado cambios en mieles que se han sido sometidas a pasteurización y a licuefacción.

También, se ha encontrado que los tratamientos térmicos aplicados a la miel ocasionan cambios significativos en otras características de calidad como pH (Díaz 2009, Turhan *et al.*, 2008 y Boonchiangma *et al.*, 2011), acidez total (Díaz, 2009; Turhan *et al.*, 2008), actividad enzimática (Díaz, 2009, Kowalsk *et al.*, 2012) fenoles totales, flavonoides totales, actividad antioxidante y viscosidad (Díaz, 2009).

- **Efecto de los tratamientos térmicos sobre propiedades bioactivas, actividad antimicrobiana, antioxidantes y antioxidante de la miel de *A. mellifera***

Las mieles que son sometidas altas temperaturas en los tratamientos térmicos generaran como resultado una mayor descomposición de peróxido de hidrógeno, una mayor reactividad de iones de metales de transición y más cantidad de reacciones redox e inclusive pueden influir sobre la estabilidad de los antioxidantes (Brudzynski & Kim, 2011).

2.7.2 Efecto del almacenamiento sobre los parámetros de calidad de la miel de abejas de *A. mellifera*

Las condiciones de almacenamiento de la miel de abejas, especialmente el efecto de la temperatura y la incidencia de la luz, puede provocar cambios significativos en los parámetros de calidad de la miel de abejas de *A. mellifera*.

▪ Efecto del almacenamiento sobre perfil de azúcares de la miel de *A. mellifera*

Los azúcares son los principales componentes de la miel, corresponden aproximadamente al 95% de su peso seco, dichos azúcares sufren degradación y disminución cuando la miel es tratada térmicamente y es almacenada (Rybak-Chmielewska 2007; Zhang *et al.*, 2012). La degradación de los azúcares se debe principalmente a la deshidratación de la fructosa y la glucosa en medio ácido en las reacciones de Maillard, pero estos cambios se evitan con un almacenamiento a 4°C (Rybak-Chmielewska, 2007).

Se han estudiado la degradación que sufre los azúcares de la miel de *A. mellifera* durante el almacenamiento. Y se encontró que las muestras de miel se incubadas a 15°C, 21°C y 37°C por 9 meses sufren disminución de los azúcares. En la miel almacenada a 37°C se degradó la sacarosa en un 3.42% por mes. A 21 °C la degradación de la sacarosa fue de 1,4% por mes y a 15°C fue de 0,81% al mes (Lichtenberg-kraag, 2012). En muestras de miel almacenadas por 6 meses a 20 °C, se encontró que el contenido de sacarosa se redujo en un 79% en comparación con su valor inicial (Rybak-Chmielewska, 2007). Igualmente sucedió en muestras de miel tratadas térmicamente con temperaturas desde 30 a 230 °C, donde se encontró que el contenido de glucosa y fructosa sufrió disminución significativa durante el calentamiento (Zhang *et al.*, 2012).

▪ Efecto del almacenamiento sobre color de la miel de *A. mellifera*

El color puede ser un indicador fiable de la calidad, ya que la miel se oscurece durante de almacenamiento, y el oscurecimiento se puede acelerar por las altas temperaturas, debido a que se intensifican las reacciones de Maillard (Zhang *et al.*, 2012 y Gonçalves 2006).

Investigadores encontraron que el cambio de color de miel floral almacenada en envases de PE a una temperatura de 37 °C durante 90 días, tiene relación con el contenido inicial de azúcares (glucosa y fructosa), lípidos totales, nitrógeno total, contenido de humedad y pH, pues a mayor humedad mayor oscurecimiento. El pH influye en la condensación de los compuestos amino-azúcar que ocasionan pardeamiento en la miel; la inestabilidad de la fructosa ocasiona una decoloración de la miel. Igualmente, en otros estudios se ha concluido que el calentamiento inicial de la miel de abejas ejerce un efecto considerable sobre el color pues este se intensifica la reacción de Maillard (Zhang *et al.*, 2012).

▪ **Efecto del almacenamiento sobre los aminoácidos libres de la miel de *A. mellifera***

El contenido de los aminoácidos se afecta significativamente cuando la miel es tratada térmicamente y es almacenada (Boonchiangma *et al.*, 2011 e Iglesias *et al.*, 2006). Al parecer la pérdida de aminoácidos se debe a transformaciones químicas que ocurren en las reacciones de Maillard, cuando la miel es calentada o cuando está almacenada en presencia de luz (Díaz, 2009). El aminoácido 2-furoylmethyl y furosina, son considerados indicador de calidad en alimentos de origen frutal, pues resultan de la interacción de la glucosa con aminoácidos libres como la lisina, durante la hidrólisis ácida.

Con el fin de averiguar si el contenido de aminoácidos disminuye durante 24 meses de almacenamiento, investigadores analizaron los aminoácidos individuales 39 mieles florales, 5 mieles de melaza y 10 mieles de mezcla almacenadas. Y se encontró que a pesar de que el contenido de aminoácidos libres en mieles de melaza y mieles de mezcla es mayores a los de las mieles florales, los cambios en el contenido de aminoácidos libres durante el almacenamiento se redujeron en los tres tipos de miel (Boonchiangma *et al.*, 2011).

▪ **Efecto del almacenamiento sobre las propiedades bioactivas, actividad antimicrobiana y antioxidantes de la miel de *A. mellifera***

La principal actividad antimicrobiana en la miel se debe a la presencia de peróxido de hidrógeno producido por la enzima glucosa-oxidasa, los flavonoides, ácidos aromáticos, los antioxidantes fenólicos (Lusby *et al.*, 2005). Los anteriores compuestos fitoquímicos responsables de la actividad antimicrobiana son sensibles a la luz y se pueden perder

durante el almacenamiento, debido a la inestabilidad química del componente activo (Brudzynski & Kim, 2011).

En un estudio se encontró que no sólo las diferencias en las composiciones químicas de la miel causan variabilidad en la actividad antimicrobiana en mieles. La estabilidad de los componentes activos puede causar diferencias en la actividad microbiana. Luego de 5 meses de almacenamiento la actividad microbiana de mieles multiflores les, se redujo en 50 % y luego se redujo gradualmente hasta los 36 meses (Brudzynski & Kim 2011).

- **Efecto del almacenamiento sobre las características sensoriales de la miel de *A. mellifera***

En su estudio se demostró que la temperatura de almacenamiento tiene un profundo impacto en la calidad de las mieles, puesto que parámetros como la composición volátil y calidad sensorial de mieles almacenadas a 10 y 20 °C durante 1 año se vieron afectadas en comparación con mieles recién cosechadas (Castro-Vázquez *et al.*, 2012)

2.7.3 Estudios de calidad en miel de abejas sin aguijón (meliponini)

En Colombia los estudios de calidad en miel de abejas sin aguijón se iniciaron con la evaluación de las características fisicoquímicas de las mieles de las principales especies de abejas sin aguijón. Debido a que se encontró que la especie de mayor adaptabilidad geográfica y nivel de producción es *T. angustula*, se profundizó en su caracterización (Fuenmayor *et al.*, 2012 y Hernández *et al.*, 2014a). El contenido de humedad del orden del 24% en este tipo de mieles evidenció la necesidad de efectuar estudios microbiológicos y de impurezas macroscópicas, simultáneamente con la evaluación de miel de *A. mellifera*. Se pudo mostrar que la humedad de la miel de abejas nativas facilita apreciablemente su deterioro microbiológico, mientras que los niveles de HMF son mucho más bajos y que la actividad diastasa cumple con los niveles establecidos con excepción de la miel *Melipona* spp, cuyo niveles de diastasa no son detectables (Hernández *et al.*, 2014b).

- **Calidad visual y calidad microbiológica de miel de abejas sin aguijón**

Se han realizado estudios que permiten evaluar los procesos de recolección de la miel de abejas sin aguijón, mediante la observación con estereoscopio de estas mieles. En el

cual se detectaron demasiadas impurezas macroscópicas (Olaya, 2014 y Olaya *et al.*, 2014). A pesar de que el *Codex Alimentarius* y otras normas técnicas para evaluación de miel, menciona que la miel debe estar libre de sustancias extrañas, a nivel mundial son pocos los estudios realizados acerca de la verificación de cumplimiento de este parámetro de calidad y su relación con las cargas microbiológicas presentes en la miel.

La valoración de impurezas en 33 muestras de miel de *T. angustula* mostró material extraño de origen vegetal un 100% de las muestras analizadas e impurezas de origen animal en 33% de las muestras. Como impurezas macroscópicas de origen vegetal se encontraron: epidermis de vegetales, fragmentos de raíz, semillas, residuos resinosos, tejido conductor y fragmentos de plantas; como impurezas de origen animal se encontraron: patas, insectos, caparazón, cabezas y alas (Olaya, 2014a).

Investigaciones que se han realizado sobre la calidad microbiológica de miel de abejas sin aguijón evidencian problemas. Un estudio realizado a 14 muestras de cinco especies de abejas sin aguijón del estado de Bahía en Brasil (5, 4, 3,1 y 1 muestras de la especie *T. Scatotrígona*, *Nanotrígona*, *Partamona* y *Frieseomelitta*; respectivamente) mostró que el 50% de las muestras tenía recuentos de mohos y levaduras por encima de los niveles permitidos en la normatividad para alimentos de Brasil (Souza *et al.*, 2009). En una evaluación realizada a 28 muestras de la especie *T. angustula*, procedentes de la provincia de Misiones en Argentina, en la cual se evaluó la presencia 6 géneros de bacterias patógenas (*Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *E. coli* y *Salmonella*), se encontró la presencia de *Clostridium* spp. Y *Bacillus* spp. en el 64 y 39% de las muestras evaluadas, respectivamente (Pucciarelli *et al.*, 2014).

En Colombia también se ha estudiado de la calidad microbiológica de mieles de abejas sin aguijón (recuentos mesófilos aerobios, mohos, levaduras, bacterias ácido lácticas, coliformes totales y fecales, *E. coli*, *Staphylococcus* catalasa positiva, anaerobios sulfito reductores y presencia de *Clostridium* spp.) de 11 muestras correspondientes a 3 especies (5 muestras de *T. angustula*, 3 muestras de *M. ebúrnea* y 3 muestras *Melipona* spp.). Los resultados mostraron que los recuentos de mesófilos aerobios, mohos y levaduras, para las tres especies, superaron los niveles establecidos por la normatividad colombiana para miel de *A. mellifera*; adicionalmente los niveles de coliformes totales y anaerobios sulfito reductor para *T. angustula*, superaron los niveles establecidos por la

normatividad colombiana para miel de *A. mellifera* (Ascencio, 2014). Resultados similares se encontraron en 10 muestras de la especie *T. angustula* (Olaya *et al.*, 2014) y en 22 de 33 muestras de *T. angustula* procedentes de Antioquia (Olaya, 2014b).

2.7.4 Efecto de los tratamientos térmicos sobre la calidad de miel de abejas sin aguijón

La miel de abejas sin aguijón se fermenta muy fácilmente debido a su alto contenido de humedad (>20%) que la hace susceptible al ataque de mohos y levaduras. Por lo que los tratamientos térmicos se han convertido en una posibilidad de estabilización de estos productos. Por ende, se han realizado varios estudios de evaluación de tratamientos térmicos sobre las características de calidad de la miel de abejas sin aguijón. En un estudio realizado a muestra de miel de *T. angustula* envasada en frascos de vidrio y tratada térmicamente a 80 °C por tiempos hasta de 30 min con intervalos de 5 min. Se encontró que el color y el HMF se incrementaron y la actividad diastasa disminuyó levemente a medida que se incrementó el tiempo de aplicación del tratamiento térmico. Mientras que los altos recuentos microbiológicos no sufrieron reducciones significativas (Hernández *et al.*, 2014c). Efectos similares de los parámetros fisicoquímicos se encontraron en muestra de miel de *T. angustula* Brasileña tratada térmicamente a 70 °C durante 4, 8, 16, 24 horas. En el cual se evaluó la acidez, pH, humedad, azúcares reductores y HMF, en el cual sólo el contenido de HMF superó los límites permitidos por la normatividad al final de los tratamientos térmicos.

2.7.5 Calidad de la miel de abejas sin aguijón durante el almacenamiento

Se ha estudiado la calidad de la miel de abejas sin aguijón durante el almacenamiento. En un estudio se almacenó miel de *T. angustula* a temperaturas de 4, 19 y 28°C durante 298 días y se evaluaron las características fisicoquímicas (humedad, Brix, pH, acidez, diastasa, HMF y color) y los parámetros microbiológicos (recuentos mesófilos aerobios, mohos, levaduras, bacterias ácido lácticas, coliformes totales y fecales, *E. coli*, *Staphylococcus* catalasa positiva, anaerobios sulfitos reductores y presencia de *Clostridium perfringens*). En general, se encontró que los parámetros fisicoquímicos evaluados para las tres temperaturas no tienen mayor variabilidad en el tiempo, excepto los valores de actividad de diastasa, color y HMF. En cuanto a los parámetros

microbiológicos, se encontraron elevadas cargas de mesófilos aerobios, mohos, levaduras y coliformes totales desde el inicio del almacenamiento para las tres temperaturas y se reportó que a pesar de que al iniciar el almacenamiento no se detectó la presencia de *Clostridium* spp. después de varios días de almacenamiento este patógeno logró niveles detectables (Ascencio, 2014). Resultados similares se encontraron en un estudio de almacenamiento a 19°C por 298 días de miel de *Melipona ebúrnea* (Hernández *et al.*, 2014c), lo que indica que las mieles de miel abejas sin aguijón requieren de tratamientos de conservación que logren un aseguramiento de la calidad del producto durante el almacenamiento.

La contaminación microbiológica de la miel de abejas sin aguijón puede provenir de fuentes primarias como el material de la colmena, flora intestinal de las abejas, néctar y flores y por contaminación cruzada durante la cosecha y almacenamiento. Respecto al proceso de cosecha, hay que mencionar que para abejas sin aguijón este proceso aún no se realiza de forma tecnificada (Baquero, 2007). Uno de los factores que más interviene en la cosecha de la miel, es la conformación y la ubicación que tiene los pots con miel dentro de la colmena. Para la especie *T. angustula*, la conformación de los pots de miel es similar a un racimo de uvas, por lo que el método de partición de pots y el escurrido ocasiona contaminación cruzada de la miel la miel, además del grado de maduración en el que se encuentre la miel al cosecharla (Ascencio, 2014).

Los hallazgos en cuanto a la inocuidad de la miel de abejas sin aguijón han motivado otros estudios a nivel de campo, enfocados en el diseño de colmenas con el fin de resolver los problemas de contaminación en las diferentes fases de producción y recolección. En la Universidad Nacional de Colombia, para la especie *T. angustula*, se realizó un diseño de colmena que no sólo considera los aspectos básicos de las necesidades en crianza de las abejas de esta especie, sino que también orienta el trabajo de las abejas para construir los pots de miel en un lugar separado del nido de cría (igual que en otros diseños de colmena) pero que además, la configuración de la colmena le permite a la abeja realizar un sólo nivel pots por alza. Lo anterior, facilita la extracción de la miel sin necesidad de destruir completamente los pots y reduce los niveles de contaminación cruzada al momento de cosechar la miel (Ascencio, 2014).

3 Materiales y métodos

Se utilizaron muestras representativas de miel de abejas *Apis mellifera* procedente de la zona cafetera de la Sierra Nevada de Santa Marta, obtenidas mediante el proyecto “*Identificación de marcadores para miel de abejas originarias de cultivos de café orgánico en la Sierra Nevada de Santa Marta*”. Las muestras de miel de *Tetragonisca angustula* se tomaron en el Jardín botánico “Joaquín Antonio Uribe” de la Ciudad de Medellín – Colombia, a través del proyecto “Reconocimiento de las características bioactivas de mieles de abejas nativas de Colombia y desarrollo de tecnologías para su conservación y empaque”. Los dos proyectos mencionados forman parte del “Programa estratégico en alternativas para la generación de valor en Productos apícolas en Colombia a través de la innovación y el desarrollo Tecnológico” que se llevó a cabo en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, con la financiación de Colciencias y la Dirección de investigación Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia (DIB); dicho programa financió además todos los recursos necesarios para la ejecución de este trabajo.

Los diferentes experimentos y ensayos se realizaron en los Laboratorios de Análisis Instrumental de Alimentos, en el Laboratorio de Propiedades Físicoquímicas de alimentos y en el Laboratorio de Biotecnología y Análisis Microbiológico del ICTA.

A continuación se describe la metodología aplicada, de acuerdo con los objetivos propuestos.

3.1 Selección de la especie de abejas sin aguijón productora de miel en Colombia

Se realizó una revisión bibliográfica acerca de las especies de abejas nativas colombianas más empleadas para la producción de miel, teniendo en cuenta la miel más promisoría para la comercialización, con base en la información encontrada

sobre los niveles de producción, cantidad de colmenas, número de nidos y el reconocimiento del producto en el mercado local e internacional.

3.2 Caracterización de miel de abejas de *A. mellifera* y *T. angustula*

Las mieles fueron caracterizadas fisicoquímica y microbiológicamente. Para los análisis fisicoquímicos se tomaron muestras representativas de acuerdo con AOAC 920.180 (AOAC, 2005). Para los análisis microbiológicos el muestreo se efectuó de acuerdo con lo indicado en la NTC 4491-1 (ICONTEC, 2005a) y en la NTC 4491-4 (ICONTEC, 2005b). Las pruebas se realizaron por duplicado empleando metodologías analíticas ya validadas en el ICTA para las matrices trabajadas.

3.2.1 Análisis microbiológicos

Los métodos empleados para esta caracterización microbiológica fueron el recuento en placa de mohos y levaduras de acuerdo con la NTC 5698-2 (ICONTEC, 2009a) y el recuento de esporas de *Clostridium* sulfito de acuerdo con la NTC 4834 (ICONTEC, 2000).

3.2.2 Análisis fisicoquímicos realizados a miel de abejas de *A. mellifera* y *T. angustula*

El contenido de humedad se determinó mediante el método de refractometría utilizando un refractómetro marca Euromex Holland de acuerdo con el método oficial 920.180 (AOAC, 2005), la acidez libre, se determinó por el método de neutralización de ácidos, utilizando un titulador automático Mettler Toledo Compact Stirrer T70 según el método oficial 962.19 (AOAC, 2005), la actividad diastasa por el método de Schade utilizando un espectro UV-VIS Spectrophotometer JASCO V-530, el HMF por el método de White utilizando un espectro Genesys UV-VIS Termo Scientific, color usando el método espectrocolorimetría en la escala Pfund de acuerdo con lo descrito por Nieto & Quicazán, (2014).

3.3 Evaluación del efecto de tratamientos térmicos sobre la calidad de la miel de *A. mellifera* y *T. angustula*

Se evaluó el efecto de dos tratamientos de pasterización a 65 °C por 15 y 21 min y dos tratamientos de tindalización a 80 °C por 15 y 21 min (tres ciclos de 5 y 7 min), sobre los parámetros fisicoquímicos y recuentos microbiológicos de la miel de abejas de las dos especies. Para aplicar los tratamientos térmicos anteriormente mencionados se dosificaron muestras de miel en frascos de vidrio estériles de vidrio de color ámbar de 60 ml de capacidad y con tapa de rosca plástica. El tratamiento de pasterización se realizó colocando los frascos que contenían la miel de abejas dentro del baño María previamente caliente 65 °C. Se utilizó un frasco de una muestra de miel del mismo lote y en las mismas condiciones para controlar la temperatura, solo hasta que la miel alcanzó una temperatura de 65 °C, se empezó a contabilizar el tiempo del tratamiento térmico (15 y 21 min); posteriormente se realizó un enfriamiento rápido en agua a 0 °C.

Se aplicaron 2 tratamientos de tindalización a 80 °C. Por lo que se realizó un tratamiento térmico a 80 °C por 5 y otro a 80 °C por 7 min se enfrió rápidamente en agua 0 °C e inmediatamente las muestras fueron incubadas en anaerobiosis a 37°C por 72 h, después se realizó nuevamente los tratamientos térmico a 80 °C por 5 y 7 min, se enfrió y se incubó nuevamente a las mismas condiciones y finalmente se realizó los últimos tratamientos a 80 °C por 5 y 7 min y se enfrió (tiempo total de los tratamientos: 15 y 21 min). Para los tres ciclos de tratamiento térmico se utilizó un frasco de una muestra de miel del mismo lote y en las mismas condiciones para controlar la temperatura de la miel, y sólo hasta que la miel alcanzó una temperatura de 80 °C se empezó a contabilizar el tiempo del tratamiento térmico.

Como variables de respuesta se utilizaron los parámetros fisicoquímicos: humedad, acidez libre, actividad diastasa y HMF los recuentos microbiológicos: mohos y levaduras, esporas de anaerobios sulfitos reductores y *Clostridium* spp.

Para elegir el tratamiento térmico adecuado con menor efecto negativo sobre las propiedades fisicoquímicas de la miel de abejas que posteriormente se almacenó, se aplicó un modelo binario de aceptación cumple o no cumple de los parámetros

microbiológicos establecidos por la normatividad (ICONTEC 2007; Ministerio de la Protección Social 2010) y se evaluó las diferencias significativas de las propiedades fisicoquímicas con análisis de varianzas (ANOVA) y una prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%. Finalmente, se eligió el tratamiento térmico que logró reducir la carga microbiología y tuvo el menor efecto negativo sobre los parámetros fisicoquímicos.

3.4 Monitoreo del almacenamiento en condiciones acelerantes miel de *A. mellifera* y *T. angustula* tindalizada a 80 °C por 15 min

Muestras de miel de *A. mellifera* y *T. angustula* fueron envasadas en frascos de vidrio estériles de color ámbar de 60 ml de capacidad. Antes de aplicar el tratamiento de tindalización a 80 °C 15 min (tres ciclos de 5 min) las muestras de miel de *A. mellifera* fue mantenida a temperatura ambiente (Apróx. 19 °C), para prevenir su cristalización y las muestras de miel de *T. angustula* fue mantenida en refrigeración a 4°C. Para la evaluación durante el almacenamiento se empleó una prueba de almacenamiento acelerado. Para ello, las muestras fueron introducidas en tres incubadoras con temperatura previamente estabilizada a 30, 40 y 50 °C y 65% HR, respectivamente.

Se realizaron 9 muestreos a diferentes tiempos de almacenamiento para cada temperatura y cada tipo de miel como se indica en la Tabla 3-1. Se evaluaron las diferencias significativas de las propiedades fisicoquímicas durante el almacenamiento para cada temperatura y cada tipo de miel mediante un ANOVA y una prueba de Tukey con un nivel de significancia 5%.

Tabla 3-1: Frecuencias de muestreo de miel de *A. mellifera* y *T. angustula* tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenada en condiciones de temperatura acelerantes de 30, 40 y 50 °C.

Tipo de miel	Temperatura de almacenamiento (°C)	Frecuencia de muestreo (Días)
<i>A. mellifera</i>	30	0 – 9 – 18 – 30- 39 - 44 – 49 – 53 - 58
	40	0 – 9 – 19 – 30- 43 - 48 – 55 – 60- 64
	50	0 – 10 – 17 – 22- 26 - 31 – 36 – 45- 56
<i>T. angustula</i>	30	0 – 9 – 15 – 29- 34 - 42 – 45 – 50- 55
	40	0 – 3 – 7 – 11 – 14 – 19 – 24 – 27 - 31
	50	0 – 0.5 – 1 – 1.5 – 2 – 2.5 – 3 – 3.5 - 4

Como variables de respuesta se utilizaron los parámetros fisicoquímicos: Humedad, acidez libre, actividad diastasa, HMF y los recuentos microbiológicos: mohos y levaduras, esporas de anaerobios sulfitos reductores y *Clostridium* spp.

3.5 Análisis cinéticos de las variables de calidad fisicoquímicas en la miel de *A. mellifera* y *T. angustula* durante el almacenamiento

La matriz de datos de los parámetros fisicoquímicos evaluados a la miel de *A. mellifera* y *T. angustula* durante el almacenamiento acelerado, fue analizada mediante una prueba estadística multivariada no supervisada: análisis de componentes principales (PCA).

Para el modelamiento de los datos experimentales de los parámetros fisicoquímicos se utilizaron los modelos descritos por (Labuza, 2000), el cual señala que la vida útil de un alimento se puede describir a través del deterioro de los índices de calidad del alimento en el tiempo, con la ecuación diferencial (2.1) y dependiendo del orden de la reacción, la ecuación se transforma en las ecuaciones (2.2, 2.3 y 2.4).

Por lo tanto, se probó la bondad de ajuste en modelos de pérdida de calidad (Ecuación 2.1) de orden cero (Ecuación 2.2), primer orden (Ecuación 2.3) y segundo orden (Ecuación 2.4) de los parámetros de calidad fisicoquímicas de la miel de *A. mellifera* y *T. angustula* almacenada a 30, 40 y 50 °C. Para probar el ajuste a modelos de orden cero se graficó el parámetro de calidad (Q) vs el tiempo (t) de almacenamiento, para el primer orden se graficó el Ln (Q) vs t, para el segundo orden se graficó 1/Q vs t y se obtuvo el coeficiente de correlación r^2 para cada grafica de cada variable y cada temperatura. Los parámetros cinéticos, la velocidad inicial y la constante de la velocidad de reacción, fueron determinados de acuerdo con Labuza (1984). Para poder estimar la velocidad de deterioro de las variables de calidad modeladas es necesario calcular la energía de activación (E_a , J/mol). Y fue posible calcularla aplicando la ecuación de Arrhenius (Ecuación 2.5) a partir de los coeficientes de velocidad a 30, 40 y 50°C.

Para obtener la energía de activación se representó $\ln(k)$ (que corresponde a la pendiente de la línea de los modelos que se obtuvieron con la ecuación 2.1 para cada variable a las tres temperaturas) con el inverso de la temperatura absoluta. De esta manera se construyó una gráfica con tres puntos, siendo su inclinación la energía de activación dividida por la constante de los gases (E_a/R).

3.6 Predicción de la vida útil de miel de *A. mellifera* y *T. angustula*

Es posible predecir el tiempo de vida útil de la miel de *A. mellifera* y *T. angustula*, a temperaturas de almacenamiento inferiores a las utilizadas en este estudio, utilizando los parámetros obtenidos en el análisis cinético para calcular en la ecuación de Arrhenius (Ecuación 2.5) el valor de k (constante de velocidad) a la temperatura deseada. Una vez obtenido el valor de esta constante, se utilizan los parámetros de $Q_{crí}$ para cada variable de calidad, el valor de esa variable en el tiempo cero Q_0 para calcular en la ecuación de pérdida de calidad de Labuza (Ecuación 2.1) el tiempo de vida útil a la temperatura deseada.

4 Resultados y discusión

A continuación se presentan los resultados correspondientes a la selección de la especie de abeja sin aguijón productora de miel con la que se trabajó, a la caracterización inicial, caracterización después de los tratamientos térmicos y el almacenamiento acelerado a 30, 40 y 50 °C de miel de las especies *Apis mellifera* y *Tetragonisca angustula*.

4.1 Selección de la especie de abejas sin aguijón productora de miel

Considerando los resultados de las investigaciones mencionadas en la revisión de bibliográfica, en cuanto a la abundancia de nidos, volumen de miel, número de colmenas y adaptabilidad a diversos ambientes naturales se puede decir que *T. angustula*, es la especie de abeja sin aguijón más promisoría en Colombia, siendo la miel de esta especie utilizada para el desarrollo de este estudio. Sin embargo, como sólo las mieles de *A. mellifera* cuentan con normatividad vigente (NTC 1273 de 2007 y Res. 1057 de 2010) y la mayor parte de estudios sobre los tratamientos térmicos y estabilidad en almacenamiento se han realizado en estas mieles, se decidió realizar en miel de *A. mellifera* los mismos estudios de tratamientos térmicos y almacenamiento que se aplicaron en la miel nativa de *T. angustula*, con el fin de establecer si se presentan diferencias en el comportamiento de los parámetros fisicoquímico y/o microbiológico.

4.2 Caracterización de miel de abejas de *A. mellifera* y *T. angustula*

En la Tabla 4-1 se encuentran los resultados de la caracterización microbiológica, en la Tabla 4-2 resultados parámetros fisicoquímicos de la caracterización realizada a muestras de miel de *A. mellifera* y *T. angustula*.

Tabla 4-1: Caracterización microbiológica de miel de *A. mellifera* y *T. angustula*

Análisis Microbiológico Log (UFC/g)	<i>A. mellifera</i>	<i>T. angustula</i>	Requisitos miel de <i>A. mellifera</i>	
			NTC 1273 de 2007 ¹	Res. 1057 de 2010 ²
Mohos y levaduras	< 1.00	2.96±0.12	2.00 máx.	2.00 máx.
Esporas de anaerobios sulfito reductores	< 1.00	< 1.00	-	2.00 máx.
<i>Clostridium</i> sp	< 1.00	< 1.00	-	-

Fuente: ¹ICONTEC, (2007) y ²Ministerio de la protección social, (2010).

Los parámetros microbiológicos de la miel de *A. mellifera* estuvieron dentro de los límites establecidos por la normatividad colombiana, mientras que en las muestras de miel de *T. angustula* los niveles de mohos y levaduras superaron los límites permitidos para miel de *A. mellifera*. Resultados de caracterización microbiológica similares se han reportado en Brasil para mieles de abejas sin aguijón (*T.*, *Scatotrígona*, *Nanotrígona*, *Partamona* y *Frieseomelitta*), donde el 50% (14 muestras totales) de las muestras caracterizadas presentaron niveles de mohos y levaduras superiores a los permitidos en la normatividad para alimentos (Souza *et al.*, 2009). En Argentina se ha reportado presencia de *Clostridium* spp. y *Bacillus* spp. en el 64% y 39% de 28 muestras de miel de *T. angustula* caracterizadas (Pucciarelli *et al.*, 2014). Igualmente en estudios realizados en Colombia con muestras de *T. angustula*, *M. ebúrnea* y *Melipona* spp. se encontraron que los recuentos de mesófilos aerobios, mohos y levaduras, para las tres especies, superaron los niveles establecidos por la normatividad colombiana para miel de *A. mellifera* (Ascencio, 2014). Los niveles de contaminación microbiológica en mieles de abejas sin aguijón podrían estar asociados al inadecuado manejo de las colmenas y prácticas de cosecha de la miel (Ascencio, 2014).

Tabla 4-2: Caracterización fisicoquímica de miel de *A. mellifera* y *T. angustula*

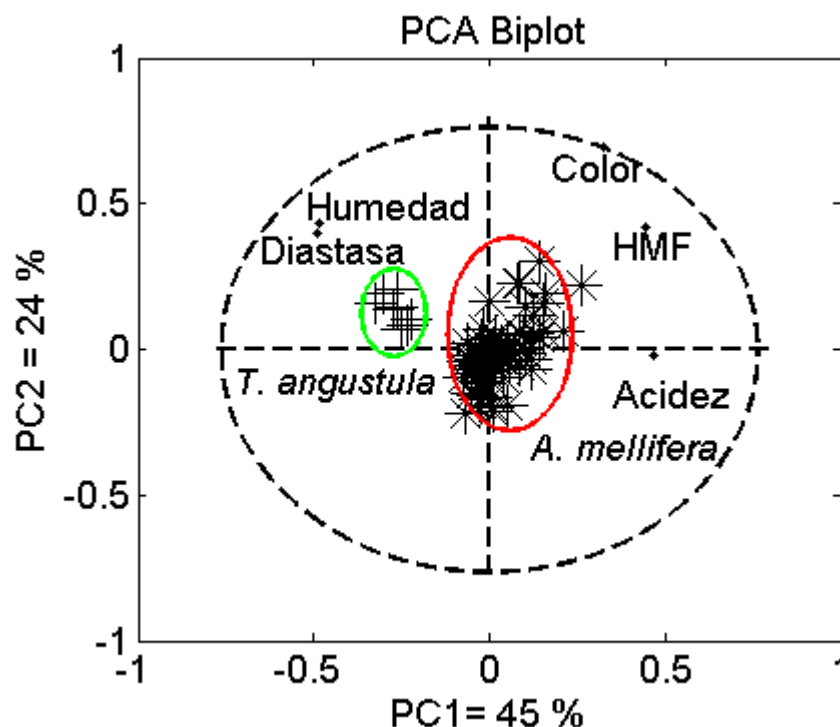
Parámetros fisicoquímicos	<i>Apis mellifera</i>				<i>Tetragonisca angustula</i>			
	Prom±DS	n	Mín.	Máx.	Prom±DS	n	Mín.	Máx.
Humedad (%)	17.6±0.84 ^a	74	16	20	23.33±0.79 ^b	4	23.63	24.46
Acidez libre (meq/kg)	43.55±5.88 ^a	74	30.07	67.98	30.44±4.75 ^b	6	29.70	39.91
Diastasa (ND)	16.73±7.24 ^a	74	5.40	39.02	38±8.71 ^b	4	30.90	49.40
Color (mm Pfund)	70.61±15.49 ^a	74	38.33	118	61.58±4.71 ^b	4	56.0	66.33
HMF (mg/kg)	14.71±17.62 ^a	74	0	88.33	0.30±0.19 ^b	6	0.0	0.74

Los valores con letras diferentes en el superíndice dentro de la misma fila son significativamente diferentes (P<0,05). Prom: promedio, DS: desviación estándar, Mín: valor mínimo, Máx: valor máximo, n: número de muestras

Los parámetros fisicoquímicos para la miel de *A. mellifera* que son indicadores de calidad y que están regulados por la normatividad colombiana, como el contenido de humedad, acidez libre, actividad diastasa y contenido de HMF cumplieron con los niveles permitidos para este tipo de miel. Pero en el caso de la miel de *T. angustula* el contenido de humedad ($23.33 \pm 0.79\%$) es superior a los niveles permitidos para miel de *A. mellifera*. Este mismo comportamiento se ha reportado para miel de abejas sin aguijón de otras especies en diversos estudios (Souza *et al.*, 2006, Dardón & Enríquez., 2008, Vit, 2009, Vit *et al.*, 2009, Anacleto *et al.*, 2009 y Anchalee *et al.*, 2012), lo que indica que es una característica diferenciadora de este tipo de mieles y por lo tanto la normatividad establecida para *A. mellifera* no es adecuada para evaluar la calidad de miel de abejas sin aguijón. Igualmente, para la miel de *T. angustula* se encontró una presencia insignificativa de HMF (0.30 ± 0.19) y se encontraron elevados niveles de actividad diastasa (38 ± 8.71) similar a lo encontrado en miel de esta misma especie en Argentina y Paraguay (Vit *et al.*, 2009b), lo que convierte la miel de esta especie en un producto particularmente interesante desde el punto de vista fisicoquímico.

Después de realizar un análisis de componentes principales de la caracterización fisicoquímica, se encontró que los dos primeros componentes principales logran explicar el 67% de la varianza total. En la Figura 4-1, se ilustran las relaciones que existen entre las muestras de miel de abejas de *A. mellifera* y *T. angustula* y las variables fisicoquímicas caracterizadas, en el que se puede apreciar de forma general que existe una clara diferenciación fisicoquímica entre la miel de estas dos especies de abejas; resultados similares fueron reportados por Fuenmayor *et al.*, (2012). El contenido de HMF, color y acidez libre son las variables fisicoquímicas significativas en la miel de *A. mellifera* mientras que la actividad diastasa y el contenido de humedad son las variables significativas para la miel de *T. angustula*. Las características fisicoquímicas son variables en la miel de acuerdo con la especie productora de miel, al origen floral y geográfico (Vit *et al.*, 1994, Vit *et al.*, 2004, Vit *et al.*, 2005; Vit, 2005; Souza *et al.*, 2006 y Quicazán *et al.*, 2009).

Figura 4-1: Análisis de componentes principales de la caracterización fisicoquímica de las muestras de miel de *A. mellifera* y *T. angustula*



4.3 Efecto de tratamientos térmicos sobre la calidad microbiológica de miel de *A. mellifera* y *T. angustula*

En las Tablas 4-3 y 4-4 se muestran los resultados de los análisis microbiológicos realizados a muestras de miel de *A. mellifera* y *T. angustula* antes y después de aplicar 2 tratamientos de pasteurización a 65 °C por 15 y 31 min y 2 tratamientos de tindalización a 80 °C por un tiempo total de 15 y 21 min.

Tabla 4-3: Características microbiológicas de miel de *A. mellifera* tratada térmicamente

Análisis Microbiológico Log (UFC/g)	Control	Pasteurización (65°C)		Tindalización (80 °C)	
		15 min	21 min	15 min	21 min
Mohos y levaduras	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
Esporas de anaerobios sulfito reductores	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
<i>Clostridium</i> ssp.	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00

Tabla 4-4: Características microbiológicas para miel de *T. angustula* tratada térmicamente.

Análisis Microbiológico log (UFC/g)	Control	Pasterización (65°C)		Tindalización (80 °C)	
		15 min	21 mi	15 min	21 min
Mohos y levaduras	2.96±0.12	1.30±0.43	1.30±0.43	2.36±0.08	2.42±0.03
Esporas de anaerobios sulfito reductores	< 1.00	2.39±0.12	1.85±0.21	< 1.00	< 1.00
<i>Clostridium</i> spp.	< 1.00	< 1.00	< 1.00	2.59±0.16	2.45±0.21

La miel de *A. mellifera* inicialmente cumple con los requerimientos microbiológicos. Luego de aplicar los cuatro tratamientos, los parámetros microbiológicos de la miel de *A. mellifera* estuvieron dentro de los límites establecidos por la normatividad colombiana. Los niveles de mohos y levaduras en miel de *T. angustula* disminuyeron, en relación al control, en todos los tratamientos térmicos (Tabla 4-4), la disminución fue más marcada para la pasteurización. Esta tendencia coincide con (Tosi *et al.*, 2004), quien reportó reducción de mohos y levaduras en mieles *A. mellifera* tratadas térmicamente. Los microorganismos presentes en la miel crecen en un rango óptimo de temperatura de 22 a 29°C y no soportan tratamientos térmicos mayores a 53°C.

La miel de abejas puede estar contaminada con microorganismos que se encuentran alojados en el polen, el néctar, en el tracto digestivo de las abejas, en el aire, en las flores y el medio ambiente. Igualmente, las malas prácticas de cosecha de la miel e inadecuados sitios de ubicación de las colmenas también pueden ocasionar contaminación microbiológica de la miel de abejas (Josiane *et al.*, 2011). Incluso la miel puede llegar a contaminarse con agentes patógenos como *Salmonella* (Collins *et al.*, 1999 y Rall *et al.*, 2003) y esporas de sulfito reductores (Collins *et al.*, 1999); esporas de *Clostridium botulinum* tipo G (Rall *et al.*, 2003 y Nevas *et al.*, 2006), *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* (Iurlina, 2005) y Coliformes (Josiane *et al.*, 2011 y Rall *et al.*, 2003). La carga inicial de microorganismos y factores como el contenido de humedad, la temperatura y el tiempo de almacenamiento favorece la aparición de procesos fermentativos en la miel de abejas (Carvalho *et al.*, 2010).

Las esporas de anaerobios sulfito reductores aparecieron en mieles de *T. angustula* pasteurizadas, excediendo los niveles permitidos por la normatividad en las

muestras pasteurizadas por 15 min. Mientras que en las muestras tindalizadas no hubo presencia de esporas de anaerobios sulfitos reductores, pero si se encontró presencia de microorganismos viables de *Clostridium* spp., a pesar de que estos microorganismos no fueron detectados en la miel antes de los tratamientos térmicos (Tabla 4-4). Lo que quiere decir que las esporas de *Clostridium* spp. pueden sobrevivir en la miel. Pues los tratamientos térmicos de pasteurización incentivan un proceso de esporulación de los microorganismos anaerobios sulfitos reductores, mientras que el proceso de tindalización por ser un proceso térmico por ciclos que involucra una incubación a 37 °C por 72 h, permite que ocurra un proceso de germinación. La importancia de estos procesos bacterianos radican en que las esporas son formas bacterianas resistentes a procesos de calentamiento, congelación, desecación o tratamientos con sustancias químicas o radiaciones, y en condiciones adecuadas pueden generar toxinas y causar enfermedades. Mientras que las células vegetativas que resultan de un proceso de germinación mueren a temperaturas superiores a 70 °C o por acción de agentes antimicrobianos (Tortora *et al.*, 2007). Es decir que los tratamientos de tindalización al ser combinados con agentes antimicrobianos o tratamientos por altas presiones hidrostáticas podrían ser una buena alternativa de estabilización de microbiológica de miel de abejas sin aguijón.

4.4 Efecto de tratamientos térmicos sobre los parámetros fisicoquímicos de miel de *A. mellifera* y *T. angustula*

A continuación se muestran los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados a muestras de miel de *A. mellifera* y *T. angustula* antes y después de aplicar 4 tratamientos térmicos diferentes, respectivamente.

4.4.1 Parámetros fisicoquímicos de miel de *A. mellifera* tratadas térmicamente

En la Tabla 4-5 se muestran los resultados de los parámetros fisicoquímicos de miel de *A. mellifera* antes y después de aplicar dos tratamientos de pasteurización a 65 °C y dos tratamientos de tindalización a 80 °C.

Tabla 4-5: Análisis fisicoquímico de miel de *A. mellifera* tratada térmicamente.

Análisis Fisicoquímico	Control	Pasterización (65°C)		Tindalización (80 °C)	
		15 min	21 min	15 min	21 min
Humedad (%)	16.71±0.55 ^a	18.52±0.06 ^b	18.19±0.08 ^b	18.91±0.38 ^b	18.82±0.03 ^b
Acidez libre (meq/kg)	39.30±0.89 ^a	37.00±0.57 ^b	37.31±0.91 ^a	36.70±0.34 ^b	37.67±1.08 ^a
Actividad diastasa	9.25±0.07 ^a	8.75±0.35 ^b	8.8±0.00 ^b	4.65±0.35 ^a	4.25±0.07 ^a
Color (mm Pfund)	48.00 ± 0.00 ^a	49.00±0.00 ^b	49.00±0.00 ^b	57.00±0.00 ^a	58.00±1.41 ^a
HMF (mg/kg)	7.04±0.99 ^a	12.07±0.58 ^b	12.60±0.16 ^b	6.22±1.80 ^a	7.18±0.73 ^a

Los valores con letras diferentes en el superíndice dentro de la misma fila son significativamente diferentes (P<0.05).

Después de los cuatro tratamientos no hubo diferencias significativas en la humedad entre 15 y 21 min de tratamiento, ni diferencias significativas entre la pasteurización y tindalización. Sin embargo, en ninguno de los casos la humedad excedió los límites establecidos por la normatividad para este parámetro (Tabla 4-5).

La actividad diastasa disminuyó significativamente con relación con la miel sin tratamiento, en todos los tratamientos térmicos (Tablas 4-5). Esta disminución fue mayor para tindalización. Dentro del mismo tratamiento térmico no tubo diferencia significativa en la actividad diastasa para 15 y 21 minutos. La tindalización redujo la actividad diastasa en un 52% mientras que la pasteurización la redujo en un 5%. La reducción en la actividad diastasa como consecuencia de un tratamiento térmico con condiciones similares ha sido reportado para miel de *A. mellifera* (Samborska & Czelejewska, 2014).

El HMF aumentó significativamente en los tratamientos de pasteurización con respecto a la miel sin tratamiento térmico (Tabla 4-5). Dentro del mismo tratamiento térmico, no hubo diferencia significativa en el HMF entre 15 y 21 minutos. La pasteurización aumentó el HMF en un 77% en *A. mellifera*. Samborska & Czelejewska (2014), reportaron incremento en el HMF en miel de *A. mellifera* tratada térmicamente, aunque estos incrementos no fueron tan marcadas como este estudio. El contenido de HMF en la miel aumenta significativamente cuando se aplican tratamientos térmicos con temperaturas mayores a 80 °C (Turhan *et al.*, 2008 y Oliveira *et al.*, 2012).

El parámetro de color aumentó significativamente con respecto a la miel sin tratamiento térmico, en los tratamientos de tindalización (Tablas 4-5). Dentro del mismo tratamiento térmico a 15 y 21 min, no hubo diferencia significativa en el color.

4.4.2 Parámetros fisicoquímicos de miel de *T. angustula* tratada térmicamente

En la Tabla 4-6 se presentan los resultados de los parámetros fisicoquímicos de la miel de *T. angustula* antes y después de aplicar dos tratamientos de pasterización a 65 °C y dos tratamientos de tindalización a 80 °C.

Tabla 4-6: Análisis fisicoquímico de miel de *T. angustula* tratada térmicamente

Análisis fisicoquímico	Control	Pasteurización (65°C)		Tindalización (80 °C)	
		15 minutos	21 minutos	15 minutos	21 minutos
Humedad (%)	22.03±1.11 ^a	23.26±0.57 ^a	23.45±0.19 ^a	23.58±0.08 ^b	24.02±0.08 ^b
Acidez libre (meq/kg)	26.08±0.17 ^a	24.61±0.61 ^b	24.58±0.22 ^b	29.57±0.69 ^c	29.55±0.39 ^c
Act Diastasa (ND)	33.28±1.01 ^a	30.25±0.92 ^b	31.70±3.11 ^b	24.08±0.73 ^c	21.25±0.21 ^d
Color (mm Pfund)	62.50±0.71 ^a	62.50±0.71 ^a	63.0±0.00 ^a	87.75±0.35 ^b	87.75±0.35 ^b
HMF (mg/kg)	ND	ND	ND	1.61±0.05 ^a	4.46±0.21 ^b

Los valores con letras diferentes en el superíndice dentro de la misma fila son significativamente diferentes (P<0.05).

El parámetro de humedad solo aumentó significativamente en relación con la miel sin tratamiento térmico, en las muestras tratadas con tindalización por 21 min (Tabla 4-6). No hubo diferencias significativas en la humedad entre 15 y 21 minutos del tratamiento de pasterización y 15 min de tindalización. Para todos los casos la humedad excedió los límites establecidos por la normatividad para miel de *A. mellifera*. Aunque es preciso mencionar que un contenido de humedad mayor, es uno de los parámetros diferenciadores entre la miel de estas dos especies de abeja.

El HMF estuvo por debajo del límite de cuantificación para las muestras sin tratamiento térmico y las tratadas con pasterización. Resultados similares se encontraron cuando aplicó tratamientos térmicos a mieles de abejas sin aguijón (Biluca *et al.*, 2014). El contenido de HMF en las muestras tindalizadas fueron bajos, pero significativamente mayores comparados con las muestras sin tratamiento térmico. Hubo diferencias significativas el contenido de HMF entre las muestras tindalizadas por 15 y 21 minutos. Este comportamiento coincide con Freitas *et al.*,

(2010), quienes reportan un aumento de HMF en mieles de abejas sin aguijón tratadas térmicamente.

La actividad diastasa disminuyó significativamente con relación con la miel sin tratamiento, en todos los tratamientos térmicos (Tabla 4-6). Esta disminución fue más notoria en los tratamientos de tindalización. Dentro del mismo tratamiento térmico no tubo diferencia significativa en la actividad diastasa para 15 y 21 minutos. La tindalización redujo la actividad diastasa en un 32% mientras que la pasteurización la redujo en un 7%. Esta reducción como consecuencia de un tratamiento térmico, con condiciones similares, ha sido reportado para miel de *A. mellifera* (Samborska & Czelejewska 2014). El parámetro de color aumentó significativamente con respecto a la miel sin tratamiento térmico, en los tratamientos de tindalización (Tabla 468). Dentro del mismo tratamiento térmico, no hubo diferencia significativa en el color para 15 y 21 minutos.

4.5. Evaluación miel de *A. mellifera* y *T. angustula* tindalizada a 80 °C por 15 min durante el almacenamiento en condiciones de temperatura acelerantes

El tratamiento térmico de tindalización a 80°C por 15 min fue elegido para tratar las mieles que se almacenaron. Las mieles de ambas especies a las que se les aplicó este tratamiento térmico, tuvieron una reducción de los recuentos microbiológicos significativos (Tablas 4-3 y 4-4) y causó el menor efecto sobre las propiedades fisicoquímicas (Tablas 4-5 y 4-6).

4.5.1. Efecto del almacenamiento en condiciones de temperatura acelerantes sobre la calidad microbiológicos de miel de *A. mellifera* y *T. angustula*

A continuación se relaciona el efecto que tuvo el almacenamiento en condiciones de temperatura acelerantes sobre los parámetros de calidad microbiológica de miel de *A. mellifera* y miel de *T. angustula*.

▪ **Calidad microbiológica de miel de *A. mellifera* durante el almacenamiento**

En la Tabla 4-7 se encuentran los resultados de los recuentos microbiológicos de la miel de *A. mellifera* tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenada a 30 °C por 55 días.

Tabla 4-7: Características microbiológicas de miel de *A. mellifera* recolectada en la Sierra Nevada de Santa Marta, tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenada a 30°C

Recuento microbiológico Log (UFC/g)	Tiempo de almacenamiento (días)								
	0	9	15	29	34	42	45	50	55
Mohos y levaduras	< 1.00	0.98±0.08	0.98±0.10	1.13±0.30	3.19±0.29	< 1.00	< 1.00	< 1.00	1.43±0.57
Esp. anaerobios sulfito reductores	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
<i>Clostridium</i> spp.	< 1.00	< 1.00	1.13±0.30	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00

Durante el almacenamiento a 30 °C los parámetros microbiológicos de la miel de *A. mellifera* estuvieron dentro de los límites establecidos por la normatividad colombiana, excepto por los niveles de mohos y levaduras a los 34 días y a la aparición de *Clostridium* spp. a los 18 días (Tabla 4-7). Los mohos y levaduras probablemente se incrementaron por la temperatura de almacenamiento (30 °C) que puede funcionar como temperatura de incubación. La aparición de *Clostridium* spp. puede obedecer al proceso de tindalización, que como se aprecia en la Tabla 4-4, pareciera estimular la aparición y/o incremento de viables de *Clostridium* spp., aunque los recuentos de este patógeno se encuentra dentro de los límites establecidos por la norma. La aparición de *Clostridium* spp. confirma el riesgo del consumo este tipo de productos en niños menores de 1 años. Por lo tanto, se deben seguir realizando investigaciones orientadas en eliminar este factor de riesgo en la miel de abejas.

En la Tablas 4-8 y 4-9 se presentan los resultados de los recuentos microbiológicos de la miel *A. mellifera* tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenadas a 40 °C por 64 días y a 50 °C por 56 °C días.

Tabla 4-8: Características microbiológicas de miel de *A. mellifera* recolectada en la Sierra Nevada de Santa Marta, tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenada a 40°C.

Recuento microbiológico Log (UFC/g)	Tiempo de almacenamiento (días)								
	0	9	19	30	43	48	55	60	64
Mohos y levaduras	1.9±0.30	< 1.00	0.98±0.10	1.2±0.20	< 1.00	< 1.00	< 1.00	1.0±0.10	< 1.00
Esporas de anaerobios sulfito reductores	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
<i>Clostridium</i> spp.	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00

Tabla 4-9: Características microbiológicas de miel de *A. mellifera* colectada en la Sierra Nevada de Santa Marta, tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenada a 50 °C

Recuento microbiológico Log (UFC/g)	Tiempo de almacenamiento (días)							
	0	10	22	26	31	36	45	56
Mohos y levaduras	1.9±0.30	< 1.00	1.0±0.03	< 1.00	< 1.00	< 1.00	0.98±0.03	< 1.00
Esp. anaerobios sulfito reductores	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
<i>Clostridium</i> spp.	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00

Durante el almacenamiento a 40 °C los parámetros microbiológicos de la miel de *A. mellifera* estuvieron dentro de los límites establecidos por la normatividad colombiana (Tabla 4-8), al igual que en el almacenamiento a 50 °C (Tabla 4-9).

▪ **Calidad microbiológica de miel de *T. angustula* almacenada**

En la 4-10 se encuentran los resultados de los recuentos microbiológicos de la miel de *T. angustula* tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenada a 30 °C por 55 días.

Tabla 4-10: Características microbiológicas de miel de *T. angustula* colectada en el Jardín Botánico de Medellín, tindalizada a 80°C por 15 min y almacenada a 30°C

Recuento microbiológico Log (UFC/g)	Tiempo de almacenamiento (días)								
	0	9	15	29	34	42	45	50	55
Mohos y levaduras	1.2±0.30	< 1.00	< 1.00	1.5±0.70	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	1.0±0.03
Esporas anaerobios sulfito reductores	1.8±0.30	1.7±0.30	1.8±0.10	< 1.00	< 1.00	1.0±0.03	< 1.00	< 1.00	< 1.00
<i>Clostridium</i> spp.	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	1.0±0.1	1.0±0.1	< 1.00	< 1.00	< 1.00

Durante el almacenamiento a 30 °C los parámetros microbiológicos de la miel de *T. angustula* estuvieron dentro de los límites establecidos por la normatividad colombiana para la miel de *A. mellifera*. Los mohos y levaduras probablemente se incrementaron por la temperatura de almacenamiento a 30 °C, que puede funcionar

como temperatura de incubación. La aparición de *Clostridium spp.* puede deberse a la tindalización, como se aprecia en la Tabla 4-4, pareciera estimular la aparición y/o incremento de viables de *Clostridium spp.* Aunque se encuentra dentro de los límites establecidos por la norma (Tabla 4-10).

En la tabla 4-11 se encuentran los resultados de los recuentos microbiológicos de la miel de *T. angustula* tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenada a 40 °C por 31 días.

Tabla 4-11: Características microbiológicas de miel de *T. angustula* colectada en el Jardín Botánico de Medellín, tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenada a 40°C

Recuento microbiológico Log (UFC/g)	Tiempo de almacenamiento (días)								
	0	3	7	11	14	19	24	27	31
Mohos y levaduras	< 1.00	1.54±1.19	1.72±1.17	1.56±1.20	< 1.00	< 1.00	< 1.00	1.27±1.20	< 1.00
Esporas anaerobios sulfito reductores	< 2.00	< 2.00	1.60	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00
<i>Clostridium spp.</i>	< 1.00	1.48	2.30	1.60	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00

Tabla 4-12: Características microbiológicas de miel de *T. angustula* colectada en el Jardín Botánico de Medellín, tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenada a 50°C

Recuento microbiológico Log (UFC/g)	Tiempo de almacenamiento (días)								
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
Mohos y levaduras	1.30±0.0	1.0±0.0	1.30±0.09	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
Esporas anaerobios sulfito reductores	<1.00	<1.00	2.30±2.08	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
<i>Clostridium spp.</i>	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00

Durante el almacenamiento a 40 °C los parámetros microbiológicos de la miel de *T. angustula* estuvieron dentro de los límites establecidos por la normatividad colombiana para la miel de *A. mellifera*. Los mohos y levaduras aparecieron eventualmente durante el almacenamiento. La aparición de estos microorganismos durante el almacenamiento, probablemente se debe a una baja presencia inicialmente, pero luego del almacenamiento a 40 °C pudo generar condiciones favorables para su crecimiento. Inicialmente no se logró una detección de esporas de anaerobios sulfito reductores y aparición de *Clostridium spp.*, sin embargo, el almacenamiento a 40 °C brindo unas condiciones favorables para estimulación de

crecimiento de estos microorganismos y pudieron ser detectados por la técnica (Tabla 4-11). Durante el almacenamiento a 50 °C los recuentos de mohos y levaduras estuvieron dentro del rango de buena calidad y sólo a las 24 horas de almacenamiento se encontró presencia de esporas de anaerobios sulfitos reductores (Tabla 4-12).

4.5.2. Efecto del almacenamiento en condiciones de temperatura acelerantes sobre los parámetros fisicoquímicos en miel de *A. mellifera* y *T. angustula*

En los Tablas 4-13, 4-14 y 4-15 se presentan los resultados de los parámetros fisicoquímicos de la miel de *A. mellifera* tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenada a 30, 40 y 50 °C, respectivamente.

Tabla 4-13: Características fisicoquímicas de miel de *A. mellifera* tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenada a 30 °C

Parámetro	Tiempo de almacenamiento (días)								
	0	9	18	30	39	44	49	53	58
Humedad (%)	19.20±0.28 ^a	18.8±0.50 ^a	18.00±0.10 ^a	18.80±0.40 ^a	18.00±0.20 ^a	18.50±0.30 ^a	18.50±0.29 ^a	18.58±0.11 ^a	19.00±0.28 ^a
Acidez libre (meq/kg)	38.59±0.36 ^a	34.74±0.51 ^b	32.10±3.23 ^b	37.80±4.00 ^a	39.20±2.30 ^a	45.30±6.34 ^d	40.40±0.62 ^c	40.7±78 ^c	42.4±0.46 ^c
Actividad diastasa (ND)	3.60 ^a	2.75±0.21 ^b	2.15 ± 0.07 ^b	ND	2.55±0.17 ^b	3.10±0.42 ^a	3.15±0.49 ^a	2.65±0.21 ^b	ND
Color (mm Pfund)	90.50±0.71 ^a	90.0±0.00 ^b	91.30±1.77 ^b	92.80±0.35 ^b	94.80±0.35 ^c	97.00±4.24 ^{bc}	96.80±2.47 ^{bc}	101.3±0.35 ^c	101.0±3.54 ^c
HMF (mg/kg)	106.28±6.80 ^a	117.57±0.60 ^b	129.91±7.60 ^c	142.7±3.9 ^{bc}	107.80±7.20 ^c	114.65±11.10 ^b	120.80±5.70 ^{bc}	124.52±10.0 ^{bc}	118.34±7.0 ^{bc}

Los valores con letras diferentes en el superíndice dentro de la misma fila son significativamente diferentes (p<0,05). ND: No detectable.

Tabla 4-14: Características fisicoquímicas de miel de *A. mellifera*, tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenada a 40 °C

Parámetro	Tiempo de almacenamiento (días)								
	0	9	19	30	43	48	55	60	64
Humedad (%)	17.9±0.00 ^{ac}	18.01±0.0 ^{ac}	18.33±0.0 ^b	18.73±0.41 ^{ac}	18.76±0.50 ^c	18.14±0.46 ^b	18.5±0.24 ^b	19.1 ± 0.04 ^a	19.25 ± 0.24 ^{ac}
Acidez libre (meq/kg) (b.h.)	30.2±0.01 ^a	28.00±1.16 ^b	29.30±0.27 ^a	28.20±0.21 ^b	28.73±0.0 ^{ac}	40.14±0.96 ^{bc}	39.79±0.69 ^c	36.57±1.55 ^b	37.14±0.00 ^{ac}
Act Diastasa (ND)	19.7±0.28 ^a	7.85±1.34 ^b	2.10±1.57 ^d	3.05±0.64 ^c	ND	3.10±0.00 ^c	ND	ND	ND
Color (mm Pfund)	56.0±9.19 ^a	68.75±0.35 ^b	80.75±4.6 ^{bc}	90.00±3.54 ^{bc}	137.30±18 ^{bc}	107±0.71 ^{bc}	115.8±11.7 ^{bc}	128.8±1.06 ^{bc}	145.00±0 ^c
HMF (mg/kg)	ND	45.15±4.77 ^b	124.3±17.8 ^c	2.54±0.34 ^b	656±224.70 ^d	291.75±2.70 ^e	368.96±5.7 ^e	397.96±5.7 ^e	1085.32±0.0 ^f

Los valores con letras diferentes en el superíndice dentro de la misma fila son significativamente diferentes (p<0,05). ND: No detectable

Tabla 4-15: Características fisicoquímicas de miel de *A. mellifera*, tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenada a 50 °C

Parámetro	Tiempo de almacenamiento (días)								
	0	10	17	22	26	31	36	45	56
Humedad (%)	17.9±0.0 ^a	19.1±1.12 ^a	18.3±0.00 ^a	18.3±0.54 ^a	21.49±0.86 ^b	19.08±0.56 ^a	18.91±0.32 ^a	18.76±0.28 ^a	19.92±0.2 ^b
Acidez libre (meq/kg) (b.h.)	30.2±0.0 ^a	31.0±1.55 ^b	32.7±0.03 ^c	34.2±0.11 ^d	34.0±0.67 ^d	34.2±0.33 ^d	48.0±0.85 ^f	45.4±0.38 ^e	43.2±0.93 ^e
Actividad diastasa (ND)	19.7±0.28	2.5±0.21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Color (mm Pfund)	56.0±9.1 ^a	88.8±0.35 ^a	141.3±7.42 ^b	150.0±0.00 ^b	150.0±0.00 ^b	150.0±0.00 ^b	150.0±0.00 ^b	150.0±0.00 ^b	150.0±0.00 ^b
HMF (mg/kg)	ND ^a	226.36±2.5 ^b	645.0±53 ^c	1622.2±241 ^c	1802±38.7 ^d	2284±251.8 ^d	2337±144 ^d	2602±143 ^e	2806±103 ^e

Los valores con letras diferentes en el superíndice dentro de la misma fila son significativamente diferentes ($p < 0,05$). ND: No detectable.

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos asociados a la frescura de la miel en *A. mellifera*, los niveles de diastasa disminuyeron, de manera leve para el almacenamiento a 30 °C (Tabla 4-23) y, significativamente para el almacenamiento a 40 y 50 °C (Tablas 4-14 y 4-15). Para el almacenamiento a 30 °C, la actividad diastasa inicial estuvo muy cerca del límite establecido en la NTC 1273 (ICONTEC, 2007) que son tres unidades de diastasa. Este comportamiento puede deberse a que la miel de *A. mellifera* empleada para este ensayo inicialmente no tenía un contenido de diastasa alto y como se vio anteriormente la tindalización reduce bastante la actividad diastasa en *A. mellifera* (Tabla 4-5). De acuerdo con esto, el efecto del almacenamiento a 30 °C sobre la diastasa no parece ser tan significativo.

Para el almacenamiento a 40 °C, la actividad diastasa cayó por debajo del valor mínimo establecido por la NTC 1273 (ICONTEC, 2007), para 19, 43 y a partir de los 55 días de almacenamiento. Este comportamiento fluctuante puede estar relacionado con los bajos niveles de actividad diastasa, ya que entre más bajo sea el nivel que se quiere medir, hay mayor probabilidad de error en la medición. Sin embargo, puede evidenciarse que el almacenamiento a 40 y 50 °C reduce apreciablemente la actividad diastasa, pues en los primeros 9 días de almacenamiento a 40 °C la reducción fue del 60% (Tabla 4-16) y en almacenamiento a 50 °C la reducción fue del 87% en los primeros 10 días (Tabla 4-15).

Para el caso del HMF, en el almacenamiento a 30 °C los niveles desde el día 0 hasta los 30 días superaron los límites establecidos por la normatividad para *A. mellifera* (60 mg/kg) (Tabla 4-13). Este comportamiento a 30 °C puede estar muy relacionado con la calidad del lote de miel empleado para este ensayo. Pues como se vio, la tindalización no incrementa los niveles de HMF de forma apreciable (Tabla 4-5). En el almacenamiento a 40 °C se superaron los niveles permitidos de HMF a partir de los 19 días (Tabla 4-14). En el almacenamiento a 50 °C se superaron los niveles permitidos de HMF a partir de los 9 días (Tabla 4-15).

En el caso de la acidez libre, se presentó un leve descenso en los 18 primeros días de almacenamiento a 30 °C (Tabla 4-10). Este leve descenso también se presentó en los 44 primeros días de almacenamiento a 40 °C (Tabla 4-14); a esta misma temperatura de almacenamiento la acidez libre se incrementó a partir de los 48 días, este incremento se vio acompañado por la aparición de acidez láctica. En contraste, para el almacenamiento a 50 °C la acidez libre se incrementó a lo largo de todo el almacenamiento, de manera más marcada a partir de los 45 días (Tabla 4-15). Para las temperaturas de almacenamiento evaluadas, las mieles de *A. mellifera* sufrieron un significativo oscurecimiento, ya que mm Pfund aumentaron (Tablas 4-13, 4-14 y 4-15).

En las Tablas 4-16, 4-17 y 4-18 se encuentran los resultados de los parámetros fisicoquímicos de la miel de *T. angustula* tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenadas a 30, 40 y 50 °C, respectivamente. La miel de *T. angustula* supera los niveles de humedad, permitidos para *A. mellifera*. En cuanto a los parámetros fisicoquímicos asociados a la frescura de la miel; los niveles de diastasa permanecieron más o menos estables a lo largo del almacenamiento a 30 °C (Tabla 4-16), con un leve descenso (entre 5.5 y 13.7%) a partir de los 50 días, con valores muy por encima del límite establecido por la normatividad. Para la miel almacenada a 40 °C la actividad diastasa sufrió una reducción progresiva desde 25.85 ± 0.78 en día 0 hasta 12.8 ± 0.28 unidades en el día 31 de almacenamiento (Tabla 4-17) e igualmente sucedió con la actividad diastasa de la miel almacenada a 50 °C que se redujo hasta 14.35 ± 0.64 unidades en 4 días de almacenamiento (Tabla 4-18).

Tabla 4-16: Características fisicoquímicas de miel de *T. angustula* colectada en el Jardín Botánico de Medellín, tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenada a 30 °C

Parámetro	Tiempo de almacenamiento (días)								
	0	9	15	29	34	42	45	50	55
Humedad (%)	24.89±0.93 ^a	26.6±0.71 ^b	23.50±0.12 ^a	23.70±0.70 ^a	22.89±0.22 ^a	23.95±0.46 ^a	25.09±1.40 ^b	22.97±0.04 ^a	23.98±0.03 ^a
Acidez libre (meq/kg)	29.70±0.40 ^a	29.39±0.19 ^a	30.02±0.79 ^b	28.95±0.87 ^a	34.27±0 ^d	33.28±0.0 ^c	31.48±1.47 ^b	30.54±0.95 ^b	31.84±1.58 ^b
Actividad Diastasa	20.85±0.35 ^a	22.6±0.35 ^b	21.55±0.64 ^b	19.55±1.20 ^a	21.45 ± 0.21 ^b	25.30±6.22 ^c	20.15±0.64 ^a	19.70±0.71 ^a	18.00±1.27 ^a
Color (mm Pfund)	82.75±0.35 ^a	85.5±0.71 ^c	83.5 ± 0.71 ^b	84.50±0.71 ^c	85.00±1.41 ^c	87.25±3.89 ^d	85.50±0.71 ^c	90.50±4.95 ^d	85.00±4.24 ^c
HMF (mg/kg)	ND	2.10±1.62	2.48 ± 1.52	12.54 ± 3.39	ND	ND	ND	ND	ND

Los valores con letras diferentes en el superíndice dentro de la misma fila son significativamente diferentes (p<0.05). ND: No detectable.

Tabla 4-17: Características fisicoquímicas de miel de *T. angustula* colectada en el Jardín Botánico de Medellín, tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenada a 40 °C

Parámetro	Tiempo de almacenamiento (días)								
	0	3	7	11	14	19	24	27	31
Humedad (%)	23.10±0.35 ^a	23.78±0.04 ^a	25.61±2.78 ^b	23.86±0.16 ^a	24.91±0.04 ^a	23.52±0.03 ^a	23.78±1.07 ^a	22.77±0.07 ^a	23.15±0.80 ^a
Acidez libre (meq/kg)	30.30±0.00 ^a	30.50±0.0 ^a	32.00±0.10 ^b	33.20±1.40 ^c	38.10±3.50 ^d	42.30±0.10 ^e	45.40±0.20 ^f	34.80±5.10 ^c	37.41±2.57 ^d
Act Diastasa (ND)	25.85±0.78 ^a	20.50±0.10 ^b	25.20±1.40 ^a	25.80±0.20 ^a	23.70±1.50 ^a	21.40±0.80 ^b	19.90±0.30 ^b	19.30±0.60 ^b	12.80±0.28 ^c
Color (mm Pfund)	79.80±0.40 ^a	80.80±1.10 ^a	88.50±2.10 ^b	87.80±1.80 ^b	89.50±3.50 ^b	90.80±10 ^b	93.30±0.40 ^c	97.30±0.40 ^d	97.50±0.70 ^d
HMF (mg/kg)	1.10±0.10 ^a	3.90±0.10 ^b	6.50±0.40 ^c	8.40±0.30 ^d	10.80±0.20 ^e	20.60±0.10 ^f	29.90±0.20 ^g	38.50±1.40 ^h	39.30±0.20 ⁱ

Los valores con letras diferentes en el superíndice dentro de la misma fila son significativamente diferentes (p<0.05). ND: No detectable.

Tabla 4-18: Características fisicoquímicas de miel de *T. angustula* colectada en el Jardín Botánico de Medellín, tindalizada a 80 °C por 15 min y almacenada a 50 °C

Parámetro	Tiempo de almacenamiento (días)								
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4
Humedad (%)	23.10±0.35 ^a	24.05±0.20 ^a	24.74±0.10 ^a	24.24±0.40 ^a	24.11±0.28 ^a	23.65±0.32 ^a	23.29±6.62 ^a	23.86±0.10 ^a	23.32±0.28 ^a
Acidez libre (meq/kg)	30.30±0.00 ^c	20.40±2.30 ^a	23.10±0.40 ^b	28.30±2.2 ^c	25.30±0.1 ^b	25.90±0.40 ^b	26.20±0.60 ^b	25.00±3.50 ^b	27.80±0.10 ^{bc}
Actividad diastasa	25.85±0.78 ^d	23.40±0.30 ^c	21.55±1.34 ^c	24.50±1.13 ^d	20±0.99 ^c	20.85±0.35 ^c	16.30±0.00 ^b	14.10±0.71 ^a	14.35±0.64 ^a
Color (mm Pfund)	79.80±0.40 ^a	94±0.71 ^b	97±1.41 ^b	97±1.41 ^b	98±0.35 ^b	102±0.71 ^c	105±1.41 ^c	107±3.54 ^c	107±2.47 ^c
HMF (mg/kg)	1.10±0.10 ^a	2.72±0.09 ^b	4.34±0.05 ^c	8.46±0.17 ^d	16.95±3.83 ^e	24.46±4.28 ^f	37.50±5.04 ^g	42.97±2.22 ^h	54.65±0.10 ⁱ

Los valores con letras diferentes en el superíndice dentro de la misma fila son significativamente diferentes (p<0.05). ND: No detectable.

Para el caso del HMF, el almacenamiento a 30 °C los niveles desde el día 0 hasta los 27 días estuvieron muy por debajo de los límites establecidos por la normatividad para *A. mellifera*, con un leve incremento a los 29 días (Tabla 4-16). Este comportamiento coincide con lo observado durante los tratamientos térmicos en *T. angustula* (Tabla 4-6). Mientras que en el almacenamiento a 40 °C el HMF aumentó significativamente desde 1.1 ± 0.1 a los 0 días hasta 39.3 ± 0.2 ppm a los 31 días de almacenamiento (Tabla 4-17) e igualmente, el HMF de la miel almacenada a 50°C aumentó significativamente hasta 54.65 ± 0.10 ppm a los 4 días de almacenamiento (Tabla 4-18). Para el almacenamiento a 30 °C la miel de *T. angustula* se oscureció.

Los valores del color Pfund aumentaron desde 82.75 mm en el día 0 hasta 85 mm en el día 55 de almacenamiento (Tabla 4-16). En el almacenamiento a 40 °C los valores de color Pfund pasaron de 79.8 ± 0.4 mm en el día 0 hasta 97.5 ± 0.7 mm en el día 31 de almacenamiento (Tabla 4-17). Mientras que el almacenamiento a 50 °C se alcanzó valores 107 ± 2.47 mm en 4 días de almacenamiento (Tabla 4-18).

4.6. Comparaciones del comportamiento del deterioro de miel de *A. mellifera* y *T. angustula*

A continuación se presenta un análisis comparativo del comportamiento del deterioro de la miel de *A. mellifera* y *T. angustula* después de los tratamientos térmicos y el almacenamiento en condiciones de temperatura acelerantes.

4.6.1 Efectos de los tratamientos térmicos sobre la calidad microbiológica de miel de *A. mellifera* y *T. angustula*

Inicialmente, la calidad microbiológica de la miel de *A. mellifera* sin tratamiento térmico estuvo entre los límites establecidos por la normatividad colombiana (Tabla 4-5). Mientras que la miel sin tratamiento térmico de *T. angustula*, en parámetros como mesófilos aerobios, mohos, levaduras, esporas de anaerobios sulfitos reductores y presencia de *Clostridium spp.* excedían los límites establecidos para miel de *A. mellifera* (Tabla 4-6). Este comportamiento coincide con los reportado por Ferrufino & Vit, (2013) para mieles de *Melipona grandis* y *T. fiebrigi*; con lo encontrado por Pucciarelli *et al.*, (2014) para mieles de *T. angustula* de tres regiones de Argentina y con los recuentos de mohos y

levaduras encontradas por Souza *et al.*, (2009) en el 92% de las muestras de miel de *T. angustula* estudiadas del estado de Bahía en Brasil. Esta situación se debe principalmente a los inadecuados métodos de cosecha y recolección que se emplean para obtener la miel de abejas sin aguijón mientras que en la apicultura ya existen métodos de recolección y cosechas estandarizadas que reducen los niveles de contaminación en la miel.

Luego de aplicar los tratamientos térmicos de pasteurización a 65°C por 15 y 21 min y tindalización a 80 °C por 15 y 21 min, se encontró que en miel de *A. mellifera* solo el tratamiento de pasteurización por 15 min logró reducir los recuentos de mesófilos aerobios y las bacterias ácido lácticas a niveles <1.00 log UFC/g. Resultados similares obtuvo Rojas, (2012) al aplicar tratamiento de pasteurización a 60 °C por 25 min en miel de abejas. Mientras que los tratamientos de tindalización a 15 y 21 min y pasteurización por 15 min, incentivaron el crecimiento de los mesófilos aerobios aunque no lograron exceder los niveles máximos permitidos en la normatividad (Tabla 4-5). Los mesófilos aerobios, mohos y levaduras se redujeron en la miel de *T. angustula* para todos los tratamiento, sin embargo, ninguno de los tratamiento térmicos fue suficiente para bajar los recuentos de mesófilos a niveles aceptables (Tabla 4-6). Los recuentos de microorganismos pueden depender en gran medida de la carga microbiana inicial que contenía la miel antes de los tratamientos térmicos, pues mieles con mayor presencia de microorganismos antes de la pasteurización, tendrán también mayor presencia de estos microorganismos al final de la pasteurización.

Contrario a la miel de *A. mellifera*, en la miel de *T. angustula* se encontró presencia de esporas de anaerobios sulfitos reductores después de aplicar los tratamientos de pasteurización por 15 y 21 min, a pesar de que inicialmente en la miel sin tratamiento estas formas microbianas no fueran detectadas. En cuanto a la presencia de *Clostridium spp.* solo fue encontrado en miel de *T. angustula* tindalizada por 15 y 21 min, a pesar de que este patógeno no fue detectado inicialmente en la miel sin tratar, lo que indica que los tratamientos de tindalización incentivan a la germinación de este microorganismo, siempre y cuando este se halle presente en la miel (Tabla 4-6).

A pesar de que se esperaba que los tratamientos de tindalización a 80 °C logaran higienizar completamente la miel y el hecho que incentive la aparición de las formas

viabiles de *Clostridium spp.* a pesar de que el microorganismo no fuera detectado inicialmente, hace que este tratamiento sea muy interesante, pues brinda la oportunidad de combinarlo con otro método de conservación de la miel (por ejemplo, adición de conservantes o tratamiento de altas presiones hidrostáticas) que logre combatir los microorganismos presentes en su forma vegetativa.

4.6.2 Efecto de los tratamientos térmicos sobre la calidad fisicoquímica de miel de *A. mellifera* y *T. angustula*

Inicialmente la miel de *A. mellifera* sin tratamiento térmico cumplía con todos los estándares de calidad fisicoquímicos establecidos en la normatividad colombiana, mientras que la miel de *T. angustula* sin tratamiento térmico, presentó contenidos de humedad >20%. La alta humedad es una característica natural de las mieles de abejas sin aguijón. Estos resultados coinciden con los reportes de humedad hechos para miel de *T. angustula* (Anacleto *et al.*, 2009). Los grados Brix tuvieron un comportamiento inverso a la humedad. Después de los tratamientos térmicos de pasteurización a 65°C por 15 y 21 min y tindalización a 80 °C por 15 y 21 min, el contenido de humedad aumentó significativamente para todos los tratamientos y para las dos especies, respecto a la miel sin tratamiento térmico (Tablas 4-5 y 4-6). En *A. mellifera* aumentó 1.65 y 2.16% para pasteurización y tindalización, respectivamente. Mientras que en *T. angustula* aumentó 1.33% y 1.77% para pasteurización y tindalización, respectivamente.

La actividad diastasa disminuyó significativamente con relación al control, en todos los tratamientos térmicos y para las dos mieles evaluadas (Tablas 4-5 y 4-6). Esta disminución fue más marcada para tindalización y para miel de *A. mellifera*. Dentro del mismo tratamiento térmico a 15 y 21 min, no hubo diferencia significativa en la actividad diastasa. La tindalización redujo la actividad diastasa en un 52% para miel de *A. mellifera* y en 32% para miel de *T. angustula*. Entre tanto, la pasteurización redujo la actividad diastasa en un 5% para miel de *A. mellifera* y en 7% para miel de *T. angustula*. La reducción en la actividad diastasa como consecuencia de un tratamiento térmico con condiciones similares ha sido reportado para miel de *A. mellifera* (Samborska & Czelejewska, 2014).

El HMF aumentó significativamente con respecto al control, para la pasteurización en *A. mellifera* (Tabla 4-5). Dentro del mismo tratamiento térmico, no hubo diferencia significativa en el HMF entre 15 y 21 min. La pasteurización aumentó el HMF en un 77% en *A. mellifera*. Se ha reportado en otros estudios, un incremento en el HMF en miel de *A. mellifera* tratada térmicamente, aunque estos incrementos no fueron tan marcadas como este estudio (Samborska y Czelejewska, 2014). Para miel de *T. angustula* el HMF estuvo por debajo del límite de cuantificación para el control y la pasteurización. Este comportamiento coincide con lo encontrado por Biluca *et al.*,(2014), cuando aplicó tratamientos térmicos a mieles de abejas sin aguijón. Los niveles de HMF para miel de *T. angustula* tindalizada fueron bajos, aunque significativamente mayores comparados con el control para 21 minutos. Este comportamiento coincide con Freitas *et al.*,(2010), quienes reportan un aumento de HMF en mieles de abejas sin aguijón tratadas térmicamente.

El color aumentó significativamente con respecto al control, para tindalización y para las mieles de las dos especies (Tablas 4-5 y 4-6). Este aumento fue más marcado para la miel *T. angustula*. Dentro del mismo tratamiento térmico, no hubo diferencia significativa en el color para 15 y 21 min. La tindalización incrementó el color en un 20% para miel de *A. mellifera* y en 40% para miel de *T. angustula*.

4.6.3 Efecto del almacenamiento en condiciones de temperatura acelerantes sobre la calidad de la miel de *A. mellifera* y *T. angustula*

A continuación se relaciona el efecto que tuvo el almacenamiento en condiciones de temperatura acelerantes sobre las características de calidad microbiológica, fisicoquímicas y sensorial en la miel de *A. mellifera* y *T. angustula*.

- **Efecto del almacenamiento en condiciones de temperatura acelerantes sobre la calidad microbiológica de miel de *A. mellifera* y *T. angustula***

Al inicio del almacenamiento a 30 °C, la calidad microbiológica de la miel de *A. mellifera* tindalizada a 80 °C por 15 min estuvo entre los límites establecidos por la normatividad colombiana (Tabla 4-7). Mientras que la miel de *T. angustula* tindalizada a 80 °C por 15 min, presentaba recuentos altos de mohos, levaduras, esporas de anaerobios sulfitos reductores; ninguno de estos parámetros excedió los límites establecidos por la

normatividad para miel de *A. mellifera* (Tabla 4-10). Esta situación indica que por sí sólo el tratamiento de tindalización no es suficiente para mejorar la calidad microbiológica de la miel de *T. angustula*. Es necesario mejorar las prácticas de cosecha y recolección de la miel para reducir la contaminación microbiana inicial e igualmente es necesario acompañar el tratamiento de tindalización con otro tratamiento de conservación para potencializar el efecto de higienización en la miel. A pesar de que inicialmente en la miel de *A. mellifera* mesófilos aerobios, mohos y levaduras no fueron detectables, durante el almacenamiento a 30, 40 °C, aparecieron intermitentemente a partir de los 9 y 3 días de almacenamiento. Para la miel de *T. angustula* los recuentos de mohos y levaduras permanecieron mayores que en la miel de *A. mellifera* durante la mayor parte del almacenamiento.

En cuanto a recuentos de esporas de anaerobios sulfitos reductores, no se encontraron en la miel de *A. mellifera* durante el almacenamiento pero si para la miel *T. angustula*. Se encontró presencia de *Clostridium spp.* en la miel de *A. mellifera* a los 15 días de almacenamiento a 30 °C. Mientras que en *T. angustula* se detectó a los 34 y 42 días de almacenamiento a 30 °C y a los 3, 7 y 11 días de almacenamiento a 40 °C. El almacenamiento a 30 y 40 °C puede ser propicio para la incubación, crecimiento de microorganismos y esporulación de formas bacterianas.

▪ **Efecto del almacenamiento en condiciones acelerantes sobre la calidad fisicoquímica de *A. mellifera* y *T. angustula***

Al inicio del almacenamiento a 30 °C la actividad diastasa de la miel de *A. mellifera* tindalizada a 80 °C por 15 min, ya se encontraba sobre el límite mínimo (3 und). Esta situación posiblemente se debe a un contenido pobre inicialmente y por la reducción que le causó los tratamientos térmicos de tindalización a 80 °C por 15 min (Tabla 4-5). Durante el almacenamiento a 30 °C el contenido de diastasa en la miel de *A. Mellifera* se redujo intermitentemente por debajo del límite mínimo establecido por la normatividad Colombiana. Para la miel de *T. angustula* el contenido de diastasa al inicio del almacenamiento a 30 °C era significativamente superior (20.85 und) al de la miel de *A. mellifera* (3.60 und). El contenido de diastasa en la miel de *T. angustula* no sufrió cambios significativos durante el almacenamiento a 30 °C, contrario a lo encontrado en *A. mellifera*.

El contenido de HMF desde el inicio del almacenamiento excedió los niveles calidad permitidos en la normatividad, para la miel de *A. mellifera*. Igualmente, durante el almacenamiento a 30 °C sufrió un leve ascenso. Contrario a esto, la miel *T. angustula* al inicio del almacenamiento a 30 °C no presentó niveles detectables de HMF y sólo se evidenció un aumento no significativo de este parámetro desde 9 hasta 29 días de almacenamiento y posteriormente el contenido de HMF no fue detectable y se mantuvo a así, hasta los 55 días finalizando el almacenamiento.

Durante el almacenamiento a 30 °C los parámetros fisicoquímicos de humedad no tuvieron cambios significativos en ninguna de las mieles evaluadas. Los parámetros como acidez libre, HMF y color tuvieron un aumento significativo para los tipos de miel. La acidez libre en miel de *A. mellifera* aumentó en un 9.9% a los 58 días, respecto a la acidez al inicio del almacenamiento, mientras que en la miel de *T. angustula* aumentó un 7.2% a los 55 días, respecto a la acidez inicial. En la miel de *A. mellifera*, el contenido de HMF aumentó en 160% a los 58 días de almacenamiento, mientras que en la miel de *T. angustula* tuvo un pico de 12% a los 29 días de almacenamiento y luego se mantuvo no detectable hasta los 55 días de almacenamiento.

Los cambios en color no fueron significativamente diferentes durante el tiempo de almacenamiento a 30 °C para ninguna de las dos especies. Pero el color si fue significativamente diferente entre la miel de ambas especies. Esta diferencia se debe a que el color es dependiente del origen botánico, geográfico y la especie de abeja productora de miel. El color aumentó un 80% a los 58 días en la miel de *A. mellifera* y 2% en la miel de *T. angustula* a los 55 días de almacenamiento. La actividad diastasa disminuyó en ambos tipos de miel. En la miel de *A. mellifera* la actividad diastasa se redujo en un 100% a los 58 días, mientras que en la miel de *T. angustula* solo se redujo en un 13.7% a los 55 días. Aunque es oportuno aclarar que la miel de *A. mellifera* inicialmente tenía una actividad diastasa muy bajo (3.60 unidades), mientras que en la miel de *T. angustula* era significativamente mayor (20.85 unidades). Durante el almacenamiento a 40 °C el parámetro fisicoquímico, humedad no tuvo cambios significativos, mientras que HMF y color que aumentaron y la actividad diastasa disminuyó significativamente en los dos tipos de miel. En la miel de *A. mellifera* el HMF aumentó de 45.15 ppm hasta 1085.32 ppm y el color aumentó 1.6 veces a los 64 días de

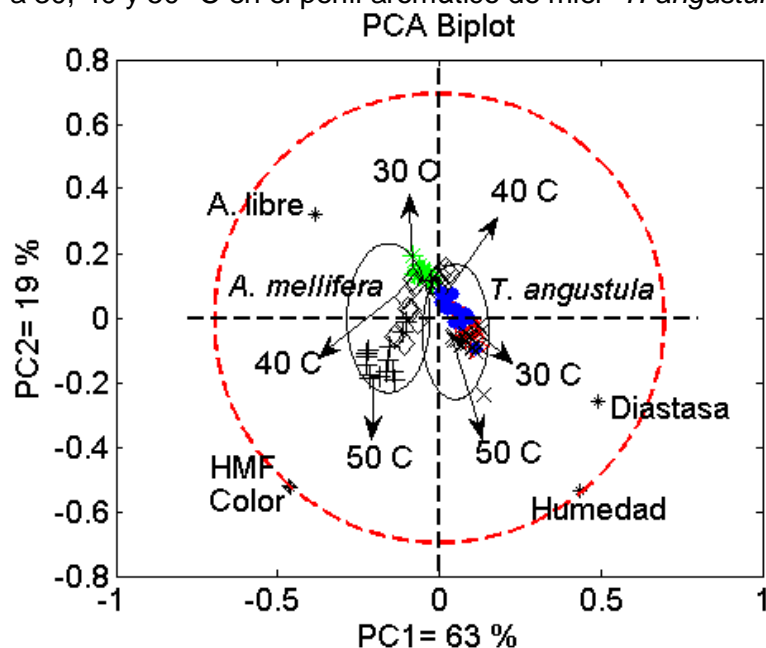
almacenamiento, mientras que en la miel de *T. angustula* el HMF aumento de 1.1 ppm hasta 39.3 ppm y el color aumento 0.22 veces a los 31 días de almacenamiento. En miel de *A. mellifera* la actividad diastasa disminuyó en un 100% a los 43 días y en la miel de *T. angustula* disminuyó en un 50% a los 31 días de almacenamiento. La acidez libre y acidez total aumentó en un 22% a los 64 días de almacenamiento en *A. mellifera* y 15% a los 31 días en *T. angustula*. De forma general, el deterioro de la miel de *A. mellifera* almacenada a 40 °C fue muy diferente de la miel *T. angustula*.

Durante el almacenamiento a 50 °C el parámetro fisicoquímico, humedad, tuvo cambios significativos, mientras que el HMF, el color y la actividad diastasa disminuyeron durante el almacenamiento. En la miel de *A. mellifera*, el HMF pasó de 0.0 a 2806 ppm, el color aumento 1.7 veces. En la miel de *T. angustula*, el HMF paso de 1.1 a 54.65 ppm, el color aumentó 0.34 veces (Tablas 4-16 y 4-17). De forma general, el deterioro de la miel de *A. mellifera* almacenada a 50 °C fue muy diferente de la miel *T. angustula*.

4.7 Análisis cinético de las variables de calidad fisicoquímicas en la miel de *A. mellifera* y *T. angustula* durante el almacenamiento

Los parámetros fisicoquímicos de la miel de *A. mellifera* y *T. angustula* fueron analizados mediante un análisis de componentes principales, en el cual dos componentes principales PC1 y PC2 explican 82% de la varianza total que corresponde a 63 y 19% respectivamente (Figura 4-2). Los parámetros fisicoquímicos de humedad y diastasa tuvieron mayor influencia en el almacenamiento de la miel de *T. angustula* y las variables de color, HMF y acidez libre total, tuvieron mayor cambios durante el almacenamiento en la miel de *A. mellifera*.

Figura 4-2: Análisis de componentes principales del efecto del almacenamiento acelerado a 30, 40 y 50 °C en el perfil aromático de miel *T. angustula* y *A. mellifera*



En las Tablas 4-19 y 4-20, se encuentran los resultados de los ajustes r^2 de las variables analizadas a 30, 40 y 50 °C, para la miel de *A. mellifera* y *T. angustula*. Durante el almacenamiento de los dos tipos de miel a cada temperatura, se realizaron mínimo 8 muestreos durante el almacenamiento, como se indicó en la Tabla 3-1. Sin embargo, durante el ajuste de los datos experimentales a los modelos matemáticos fue necesario prescindir en todas las variables de algunos valores anómalos a la tendencia de los datos en general, con fin de mejorar el ajuste de los datos a los modelos cinéticos.

Tabla 4-19: Coeficientes de correlación de las variables fisicoquímicas de la miel de *A. mellifera* almacenada a 30, 40 y 50 °C según el orden de reacción de modelos cinéticos

Variable	Orden de reacción	Valor de ajuste al modelo r^2		
		30 °C	40 °C	50 °C
Acidez libre	Cero	0.984	0.905	0.995
	Primer	0.987	0.904	0.997
	Segundo	0.988	0.902	0.995
HMF	Cero	0.983	0.987	0.892
	Primer	0.951	0.930	0.755
	Segundo	0.867	0.726	0.576
Color	Cero	0.919	0.934	0.915
	Primer	0.926	0.972	0.899
	Segundo	0.931	0.981	0.884

Tabla 4-20: Coeficientes de correlación de las variables fisicoquímicas de la miel de *T. angustula* almacenada a 30, 40 y 50 °C según el orden de reacción de modelos cinéticos

Variable	Orden de reacción	Valor de ajuste al modelo r^2		
		30 °C	40 °C	50 °C
Acidez libre	Cero	0.833	0.938	0.934
	Primer	0.833	0.948	0.931
	Segundo	0.834	0.954	0.928
HMF	Cero	0.865	0.951	0.936
	Primer	0.965	0.977	0.968
	Segundo	0.695	0.849	0.762
Color	Cero	0.99	0.922	0.971
	Primer	0.99	0.913	0.973
	Segundo	0.99	0.901	0.974
Actividad diastasa	Cero	0.875	0.936	0.960
	Primer	0.854	0.943	0.945
	Segundo	0.832	0.949	0.913

Una vez obtenidos los valores de correlación del ajuste de los datos experimentales de los parámetros fisicoquímicos de la miel de *T. angustula* y *A. mellifera* almacenadas a 30, 40 y 50 °C. Se hizo la elección de un modelo del mismo orden de reacción para cada variable. En la Tabla 4-32 se encuentran consolidados los parámetros para cada modelo (velocidad inicial, constante de velocidad, valores críticos y valor del ajuste). El límite crítico (Q cri) de los parámetros de HMF, diastasa y acidez se establecieron de acuerdo con lo que especifica la normatividad (NTC 1257 de 2007) para miel de *A. mellifera*. El límite crítico del parámetro de color se estableció para *A. mellifera* como ≤ 90 mm en la escala Pfund. El color en la miel de *A. mellifera* está influenciado por el origen botánico y floral del néctar, pero se encontró también que para la miel de procedencia de la Sierra Nevada de Santa Marta durante el almacenamiento, el color está directamente relacionado con la formación de HMF y mieles con valores de color por encima de los 90 mm en la escala Pfund tienen valores de HMF por encima de 60 mg/kg y por lo tanto, no se considera una miel de buena calidad. Considerando que para la miel *T. angustula* no sea establecido una normatividad, se utilizaron los mismos límites críticos que en la miel de *A. mellifera*. Pero para el caso de la miel de *T. angustula* el color es muy diferente de acuerdo a su origen geográfico del meliponario sin importar que la especie de abeja sea la misma. Y el parámetro de color en la miel de *T. angustula* es más sensible a cambios durante almacenamiento en comparación con los parámetros de HMF o diastasa. Por lo tanto, se estableció como límite crítico un cambio de color inicial del 35%.

Tabla 4-21: Parámetros consolidados de los modelos cinéticos para la miel de *T. angustula* y *A. mellifera* a diferentes temperaturas

Tipo de miel	T (°C)	Variable	Q _{Cri}	Velocidad inicial	Constante de velocidad	Orden reacción	R ²
<i>T. angustula</i>	30	Acidez libre	>50 meq	29.41	0.037	Cero	0.782
	40			28.52	0.654		0.948
	50			22.66	1.242		0.934
	30	Color	0.35C ₀	82.68	0.063	Cero	0.99
	40			81.86	0.521		0.922
	50			91.78	3.983		0.971
	30	HMF	≥60 mg/kg	-1.183	0.420	Cero	0.865
	40			-4.653	1.438		0.930
	50			-6.183	13.96		0.936
	30	Actividad diastasa	≤ 3	22.81	-0.072	Cero	0.875
	40			28.42	-0.346		0.936
	50			28.07	-3.654		0.960
<i>A. mellifera</i>	30	Acidez libre	>50 meq	3.514	0.003	Uno	0.987
	40			3.248	0.005		0.904
	50			3.364	0.007		0.997
	30	Color	≥90 mm	4.481	0.002	Uno	0.926
	40			4.124	0.012		0.972
	50			4.077	0.045		0.899
	30	HMF	≥60 mg/kg	2.946	2.447	Cero	0.983
	40			-150.3	17.77		0.987
	50			-275.5	71.91		0.892

Los parámetros cinéticos mostraron diferentes tendencias de acuerdo con la temperatura de almacenamiento. A 50 °C se presentaron las velocidades iniciales y las constantes de velocidad más altas. Al realizar una comparación de las velocidades cinéticas de las características fisicoquímicas de miel de *A. mellifera* y *T. angustula*, se encontró que las características HMF y acidez libre cambian durante el almacenamiento acelerado con mayor velocidad en la miel de *A. mellifera*, mientras que el color cambia con mayor velocidad en la miel de *T. angustula*. No fue posible realizar el modelamiento del cambio en la actividad diastasa durante el almacenamiento acelerado para la miel de *A. mellifera* porque esta enzima se agotó rápidamente. Mientras que la miel de *T. angustula* esta actividad enzimática tuvo una degradación menos veloz, durante el almacenamiento acelerado.

En varias investigaciones en los cuales se ha estudiado el HMF en miel de *A. mellifera* almacenada a altas temperaturas, también se ha encontrado que la cinética de formación de este compuesto es de orden cero (Carabasa & Ibarz 2000, Ajandouz *et al.*, 2001, Gentry & Roberts, 2004 y Fallico *et al.*, 2009) Lo que significa que la formación de HMF

no es dependiente de la concentración inicial de ningún componente de la miel (Boonchiangma *et al.*, 2009). Igualmente, se ha estudiado el cambio de color (ΔE) de la miel en almacenamiento y se ha encontrado que este parámetro tiene una cinética de orden cero (Bulut & Kilic, 2008), similar a lo encontrado en la miel de *T. angustula* en este estudio. Algunos investigadores sugieren que el mecanismo de oscurecimiento en la miel durante el almacenamiento está relacionado con la degradación de los polifenoles (Gonzales *et al.* 1999). Esta afirmación podría tener validez para explicar lo encontrado en este estudio, pues la miel de *T. angustula* tuvo los mayores cambios de color durante el almacenamiento y a su vez, tuvo mayores cambios en el contenido de fenoles totales en comparación con la miel de *A. mellifera*.

Conociendo las constantes de velocidad a tres temperaturas fue posible calcular la energía de activación empleando la ecuación de Arrhenius (Ecuación 2-5). Para eso se graficó los valores de $\ln K$ vs el inverso de la temperatura absoluta de almacenamiento $1/T$ (°K). En el cual la pendiente de la recta corresponde a la relación entre energía de activación y la constante de los gases ($-E_a/R$). Los valores de E_a para cada una de las variables fisicoquímicas modeladas se encuentran relacionadas en la Tabla 4-23.

Tabla 4-23: Parámetros de la ecuación de Arrhenius de las características fisicoquímica modeladas de la miel de *A. mellifera* y *T. angustula*

Tipo de miel	parámetros	($-E_a/R$)	E_a (kJ/mol)	Exp(A)	r^2
<i>T. angustula</i>	Acidez libre	17388	144563.83	4.18	0.893
	Color	20308	2442.49	64.21	0.999
	HMF	17101	2056.77	60.51	0.964
	Actividad diastasa	19187	2307.66	55.35	0.982
<i>A. mellifera</i>	Acidez libre	4157	499.97	7.93	0.990
	Color	15270	1836.56	44.21	0.995
	HMF	16583	1994.47	55.67	0.993

Luego del análisis cinético de las características fisicoquímicas de miel de las dos especies de abejas. Se puede corroborar que el deterioro la miel de *A. mellifera* ocurre más rápido, en comparación con la miel de *T. angustula*, pues los valores de energía de activación son mayores para las características de esta última. Siendo el parámetro de acidez libre el que tuvo la menor energía de activación para la miel de *A. mellifera* y el parámetro de HMF para la miel de *T. angustula*. Es posible decir que los cambios de

color y HMF en la miel de *A. mellifera* durante el almacenamiento ocurren casi al mismo tiempo pues los valores de energía de activación no difieren significativamente. Contrario, a lo encontrado en la miel de *T. angustula*, donde el mayor de energía de activación fue para el color y el menor valor se encontró para el HMF.

Figura 4-3: Representación gráfica del cálculo de la energía de activación de los parámetros fisicoquímicos de la miel de *T. angustula*

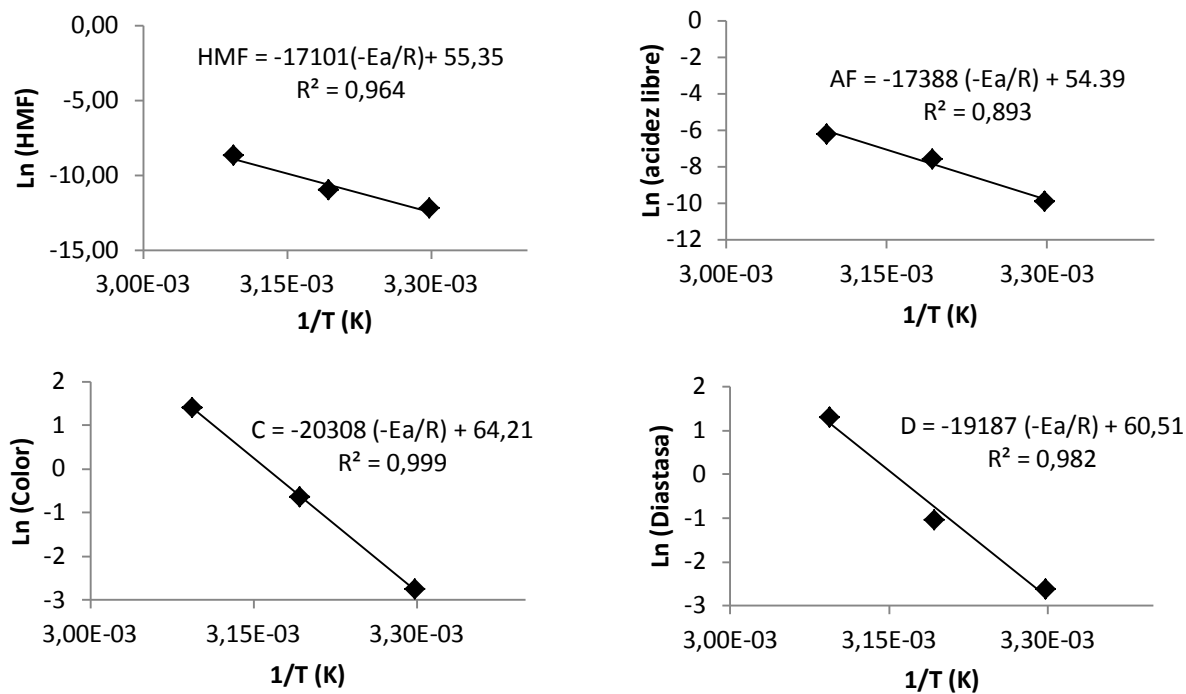
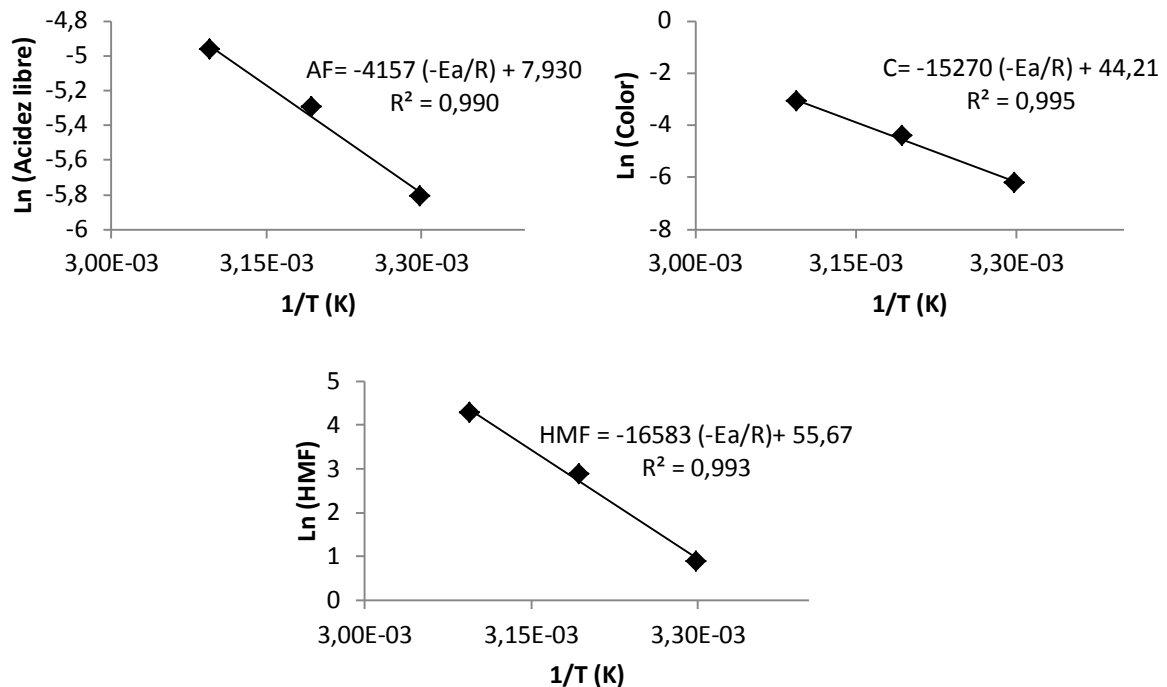


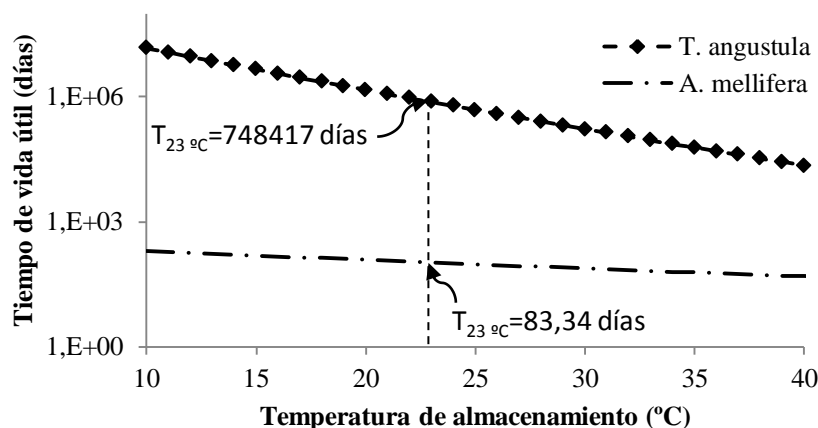
Figura 4-4: Representación gráfica del cálculo de la energía de activación de los parámetros fisicoquímicos de la miel de *A. mellifera*



4.8 Predicción de la vida útil de miel de *A. mellifera* y *T. angustula*

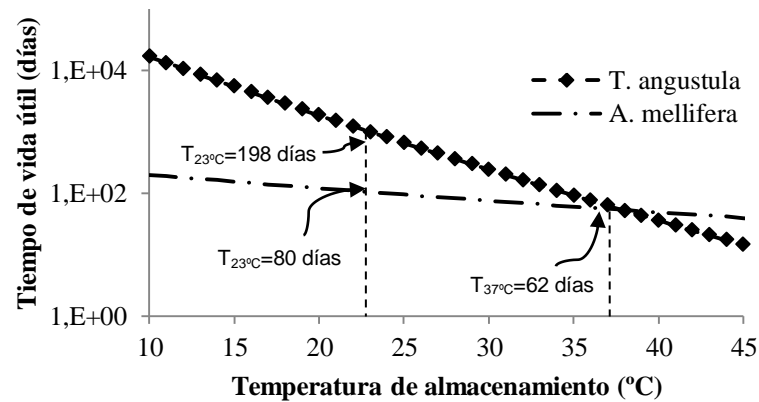
Se estimó el tiempo de vida útil de la miel de *A. mellifera* y *T. angustula* utilizando de los parámetros cinéticos de la Tabla 4-33 para calcular usando la ecuación de Arrhenius (2.5) los valores de k del HMF y acidez libre a temperaturas de 10 °C hasta 40 °C. Finalmente, considerando el comportamiento del HMF durante el almacenamiento, se utilizaron los modelos cinéticos de orden cero, los parámetros de calidad de la Tabla 4-5 en el cual para HMF el valor $Q_{crí} = 60$ ppm y $Q_0 = 0$ ppm para estimar el tiempo de vida útil de estos dos tipos miel en función de la temperatura de almacenamiento como se muestra en la Figura 4-5. De acuerdo con esta estimación el tiempo de vida útil de la miel de *A. mellifera* y *T. angustula* almacenada a 23 °C sería de 83.34 y 748417 días, respectivamente.

Figura 4-5: Vida útil de miel de *A. mellifera* y *T. angustula* de acuerdo a la cinética de formación de HMF en función de la temperatura de almacenamiento.



Considerando el comportamiento de la acidez durante el almacenamiento, se utilizaron los modelos cinéticos de primer orden para *A. mellifera* y segundo orden para *T. angustula* y los parámetros de calidad de la Tabla 4-32 en el cual para acidez libre el valor para los dos tipos de miel, es $Q_{crí} = 50$ meq y $Q_0 = 29,7$ meq para *T. angustula* y $Q_0 = 38,59$ meq para *A. mellifera* (Los valores Q_0 se obtuvieron de la caracterización inicial de acidez de los dos tipos de miel). Con los anteriores parámetros fue posible estimar el tiempo de vida útil de estos dos tipos de miel en función de la temperatura de almacenamiento como se muestra en la Figura 4-6. De acuerdo a esta estimación el tiempo de vida útil de la miel de *A. mellifera* y *T. angustula* almacenada a 23 °C sería de 80 y 198 días, respectivamente. No obstante, se encontró el mismo tiempo de vida útil (62 días) para los dos tipos de miel cuando la temperatura de almacenamiento es de 37 °C. Este resultado tiene gran importancia si se tiene en cuenta que 37 °C corresponde a la temperatura ideal para el crecimiento de microorganismos responsables de procesos de fermentación (mesófilos aerobios, mohos y levaduras). En todos los casos acidificación sería más rápida en la miel de *T. angustula* por tener los más altos contenidos de humedad, y la cinética de segundo orden nos indica que este proceso de acidificación es dependiente de la acidez inicial de la miel.

Figura 4-6: Vida útil de miel de *A. mellifera* y *T. angustula* de acuerdo a la cinética de comportamiento de la acidez libre en función de la temperatura de almacenamiento.



Cuando se realiza la estimación de la vida útil de un producto considerando el comportamiento de diversas variables y estos valores de tiempo de vida útil no concuerdan, es adecuado considerar sólo el menor tiempo de vida útil estimado, con fin de garantizar la calidad del producto durante el almacenamiento. Para el caso, de las mieles de abejas de este estudio se considerarían los tiempos de vida útiles calculados a partir de la variable de acidez libre.

5 Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

En Colombia la especie de abejas sin aguijón con mayor abundancia de nidos, volumen de miel por colmena, número de colmenas y adaptabilidad a diversos ambientes naturales es la especie *T. angustula*, por lo tanto, miel de esta especie fue utilizada para el desarrollo de este estudio.

La calidad microbiológica de la miel de *A. mellifera* sin tratamiento térmico estuvo entre los límites establecidos por la normatividad Colombiana. La miel sin tratamiento térmico de *T. angustula*, no cumple los requisitos de calidad microbiológica mohos, levaduras, esporas de anaerobios sulfitos reductores y presencia de *Clostridium* spp. tomando como base los reglamentos existentes para miel en Colombia. Esta situación posiblemente se debe a los inadecuados métodos de cosecha y recolección que se emplean para obtener la miel de abejas sin aguijón.

La pasteurización no es suficiente para reducir los niveles de mohos, levaduras y esporas de microorganismos anaerobios sulfitos reductores en las mieles estudiadas. Al aplicar la tindalización a la miel de *T. angustula* los mohos y levaduras se redujeron para todos los tratamientos pero los viables de *Clostridium* spp. Lo cual implica que indispensablemente es necesario mejorar las condiciones de cosecha de la miel, pues de lo contrario se requerirían tratamientos térmicos demasiado prolongados.

Clostridium spp. solo fue encontrado en miel de *T. angustula* tindalizada por 15 y 21 min, a pesar de que este patógeno no fue detectado inicialmente en la miel sin tratar, lo que indica que los tratamientos de tindalización incentivan a la germinación de este microorganismo, siempre y cuando este se halle presente en la miel. La anterior característica hace que el tratamiento de tindalización sea muy interesante, pues brinda la oportunidad de que al combinarlo con otro método de conservación, logre combatir los microorganismos presentes en su forma vegetativa en la miel.

El tratamiento térmico de tindalización a 80°C por 15 min fue elegido para tratar las mieles que se almacenaron. Las mieles de ambas especies a las que se les aplicó este tratamiento térmico, tuvieron una reducción significativa en los recuentos microbiológicos y causó el menor deterioro las propiedades fisicoquímicas.

El contenido de HMF, la actividad diastasa y el color son los parámetros fisicoquímicos que más se afectan por el calentamiento. Aunque el efecto, es mayor en la miel de *A. mellifera* en comparación con la de *T. angustula*. Durante el almacenamiento en condiciones de temperatura acelerantes la miel de *A. mellifera* sufre mayores cambios en los parámetros fisicoquímicos como diastasa, color y HMF. En cambio, la miel de *T. angustula* sufrió cambios fisicoquímicos significativamente menores a los registrados en la miel de *A. mellifera* durante el almacenamiento.

Para la miel de *A. mellifera* los recuentos microbiológicos permanecieron estables durante el almacenamiento, solo a 30 °C y después de 15 días de almacenamiento hubo presencia de *Clostridium* spp. a pesar de que inicialmente no fue detectado. En la miel de *T. angustula* los recuentos microbiológicos permanecieron estables pero superaron los límites permitidos en *A. mellifera*. Hubo recuentos de esporas de anaerobios sulfito reductores. en la miel almacenada a 30, 40 y 50 °C y presencia de *Clostridium* spp. en la miel almacenada a 30 y 40 °C, a pesar que inicialmente este patógeno no fue detectado. y dentro los niveles permitidos durante el almacenamiento en miel *A. mellifera*. Mientras que se encontró presencia de esporas de microorganismos anaerobios reductores y se confirmó la presencia de *Clostridium* spp. durante el almacenamiento de miel de *T. angustula*, a pesar de que inicialmente estos microorganismos no se lograron detectar en esta miel.

El deterioro que ocurre en la miel de *A. mellifera* pudo ser detectada por un grupo de panelistas especializados en la evaluación de miel de abejas. Las variables de color y sabor sufrieron los mayores cambios y dichos cambios fueron proporcionales a la temperatura de almacenamiento. Al final del almacenamiento, las muestras se percibieron amargar y más oscuras.

Es posible representar los cambios fisicoquímicos ocurridos en la miel de *A. mellifera* y *T. angustula* durante el almacenamiento a través de modelos cinéticos de pérdida de calidad. En la miel de *A. mellifera* se encontró que los parámetros de acidez libre, color y HMF logran representar adecuadamente el deterioro que ocurre de esta miel en el almacenamiento acelerado. Mientras que en la miel de *T. angustula* se logró representar los cambios que ocurren en la miel a través de las variables de acidez libre, color, diastasa y HMF.

Con los modelos cinéticos obtenidos para cada una de las variables y para cada tipo de miel, fue posible calcular la energía activación y la constante de Arrhenius. Estos parámetros son útiles para poder estimar el tiempo de vida útil de la miel a temperaturas de almacenamiento inferiores a las del estudio.

La energía de activación fue menor para las variables fisicoquímicas de la miel de *A. mellifera* en comparación con la de las variables fisicoquímicas de la miel de *T. angustula*. Lo que demuestra que el deterioro fisicoquímico ocurre más rápidamente en la miel de *A. mellifera*.

Fue posible estimar la vida útil de la miel *A. mellifera* y *T. angustula* a temperaturas de almacenamiento inferiores a las utilizadas en el estudio, utilizando los parámetros cinéticos de HMF y acidez libre. A la temperatura ambiente promedio de la ciudad de Bogotá D.C (Apróx. 23 °C), considerando el deterioro representado por la acidificación de la miel se estimó un tiempo de vida útil de 80 y 198 días para la miel de *A. mellifera* y *T. angustula* con la que se realizó este estudio.

Los modelos de vida útil planteados en este estudio permiten estimar la vida útil a diferentes temperaturas de almacenamiento, de miel de *A. mellifera* y *T. angustula* solo determinando los valores de HMF y acidez libre.

5.6 Recomendaciones

Teniendo en cuenta que el efecto de los tratamientos térmicos sobre la calidad fisicoquímica y microbiológica en la miel de *T. angustula* es muy diferente a la miel de *A.*

mellifera, sería conveniente realizar este tipo de estudios con miel de otras especies de abejas sin aguijón y con fin de establecer si existen diferencias en comportamiento de la calidad entre miel de abejas sin aguijón frente a estos mismos tratamientos térmicos.

Considerando la tendencia de conservar los compuestos bioactivos naturales en los productos empleando tindalización, que hasta el momento sólo se han estudiado en el área de farmacia. Se recomienda estudiar la estabilización de productos alimenticios desde el punto vista de inocuidad, empleando procesos de tindalización combinados con otros procesos de conservación como la adición de agentes antimicrobianos o el empleo de nuevas tecnologías como las altas presiones. Estudios de este tipo serían oportunos para la inocuidad de la miel de abejas, pues la posible presencia de *Clostridium ssp.* en este alimento es la causa que la miel no pueda ser consumida por niños menores de 1 años.

Bibliografía

- Adebayo, A. Davies, B. (2012). Microbiological Examination Of Honey Marketed In Southwestern Nigeria. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*.2(2):1701-1705.
- Ajandouz, E. Tchiakpe, L. Dalle, O. Benajiba, A. Puigsever, A. (2001). Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model system. *J. Food Sci.* 66, 926–931.
- Almeida-Muradian, L. Capítulo 26. (2013). *Tetragonisca angustula* Pot-Honey Compared to *Apis mellifera* Honey from Brazil Springer Science+Business Media New York. 417-427. In: En Vit P, Pedro S, Roubik D, editors. Pot-Honey, A Leg. stingless bees. 417–427
- Alves, R. (2013). Production and Marketing of Pot-Honey. In: Vit P, Pedro S, Roubik D, editors. Pot-Honey. A Leg. stingless bees. (1ra Ed. Sci. Media; New York, USA. xxviii. 541–556.
- Aguilar, I; Herrera, E; Zamora, G. (2013). Stingless Bees of Costa Rica. En: Vit P, Pedro SRM, Roubik DW, editors. Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees. Berlin. *Springer Verlag*: 113-124.
- Anacleto, D. Souza, B. Marchini, L. Moreti, A. (2009). Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula* latreille, 1811). *Ciência e Tecnologia de Alimentos Campinas* 29(3): 535-541.
- Anchalee, S. Pilanee, V. Sukantaros, T. (2012). Comparative composition of honey from Thai stingless bee and European honeybee (*Apis mellifera* L). Proceedings of the 47th Kasetsart. *University Annual Conference, Kasetsart* 17-20: 139-144.
- Anzueto, C. (2012). Modelos matemáticos para estimación de vida útil de alimentos en: Congreso Food & Beverage Technology Summit. San Salvador.
- AOAC.(2005). *Official Methods of Analysis*. Association of Analytical Communities International. Washington, DC, USA. 1298 pp.
- Ascher, J. Pickering, J. (2013). Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: *Anthophila*). Disponible en: http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species
- Ascencio, D. (2014). Evaluación de los cambios pre y postcosecha de la miel de especies de abejas sin aguijón. Tesis. Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. 208 p.
- Ayala, R. González, V. Engel, M. (2013). Mexican stingless bees (Hymenoptera: Apidae): diversity, distribution and Indigenous knowledge. En: Vit P, Pedro SRM, Roubik DW,

- editores. Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees. Berlin. Springer Verlag. p. 135-152.
- Ballivián, J. (2008). Abelhas nativas semferrão - Mý g Pě. São Leopoldo, Brasil. Ed. Oikos Ltda. 128 p.
- Baquero, L. Stamatti, G. (2007). Cría y Manejo de Abejas sin aguijón, Pro Yungas, ediciones Subtrópico. Tucumán Argentina, C. 35.
- Baroni, M. Nores, M. Díaz, M. Chiabrando, G. Fassano, J. Costa, C. (2006). Determination of volatile organic compound patterns characteristic of five unifloral honey by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry coupled to chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* 54(19):7235–7241
- Belitz, H. Grosch, W. Schieberle, P. (2009). Chemical food.4th revised and extended Edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1114 p.
- Bianchi F, Careri M, Musci M. (2005). Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey: Characterisation of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chem.* 89(4):527–532.
- Biluca, F. Della Betta, F. Pirassol, G. Morilla, L. Valdemiro, L. Oliveira, A. Fett, R. (2014). 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment. *Food Chemistry* 159: 244–249.
- Bogdanov, S. (2002). Harmonised methods of the International Honey Commission.
- Bogdanov, S. Charrière, J. Imdorf, A. Kilchenmann, V. Fluir, P. (2002). Determination of residues in honey after treatments with formic and ocalic acid under field conditions. *Apidologie* 33: 399 – 409.
- Bogdanov, S. (2009). Honey Composition. The Honey Book, Chapter 5.
- Boonchiangma, S. Chanthai, S. Srijaranai, S. Srijaranai, S. (2011). Chemical Compositions and Non-Enzymatic Browning Compounds of Thai Honey: a Kinetic Study. *J. Food Process Eng.* 34(5):1584–1596
- Brudzynski, K. Kim, D. (2011). The relationship between the content of Maillard reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys. *Food Chem* 124(3):869–874.
- Bulut, L. & Kilic, M. (2009). Kinetics of hydroxymethylfurfural accumulation and color change in honey during storage in relation to moisture content. *Journal of Food Processing and Preservation* 33: 22–32.
- Carabasa, G. Ibarz, R. (2000). Kinetics of colour development in aqueous glucose systems at high temperatures. *J. Food Eng.* 44: 181–189.
- Carvalho, M. Meirinho, S. Estevinho, M. (2010). Yeast species associated with honey: different identification methods. *Arch Zootec* 59: 103–113.

- Castro-Domínguez, A. (2004). Botulismo: Aspectos clínicos, epidemiológicos y reporte de caso. reporte tecnico de vigilancia. cuba: Ministerio de Salud Pública de Cuba, Alimentos PdVdIETpl. 504.
- Castro-Vázquez, L. Díaz-Maroto, M. González-Viñas, M. Pérez-Coello, M. (2009). Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chem.* 112(4):1022–1030.
- Castro-Vázquez, L. Alañon, E. Gonzalez, M. Pérez, S. (2012). Changes in the volatile fractions and sensory properties of heather honey during storage under different temperatures. *European Food Research and Technology* 235(2):185–193
- Cavia, M. (2002). Studio del envejecimiento de mieles de Burgos y Galicia: Influencia de la granulación inducida. Tesis doctoral. Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos. Area de Nutrición y Bromatología. Facultal de Ciencias. Universidad de Burgos. Burgos – España.
- Cavia, M. Ferna, M. Huidobro, F. (2007). Food Chemistry Evolution of acidity of honeys from continental climates : *Influence of induced granulation* 100:1728–1733.
- CONACYT. (2008). Consejo nacional de ciencia y tecnología. NSO 67.19.01. Miel de abejas – especificaciones. 12 p.
- COVENIN. (1984). Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN 2194, Miel de Abejas. Fondonorma. 5 p
- Collins, C. Lyne, P. (1999). Collins and Lyne's microbiological methods (7th ed.). Butterworth-Heinemann, Oxford.213–21.
- Cotte, J. Casabianca, H. Chardon, S. Lheritier, J. (2004). Chromatographic analysis of sugars applied to the characterisaion of monofloral honey. *Anal. J. Chem.* 380: 698–705.
- Cotte, J. Casabianca, H. Giroud, B. Albert, M. Lheritier, J. Grenier, M. (2004). Characterization of honey amino acid profiles using high- pressure liquid chromatography to control authenticity. *Anal.Bioanal. Chem.* 378(5):1342–50.
- Crane, E. (1992).The past and present status of beekeeping with stingless bees. *Bee World* 73(1): 29–42.
- Dardón, M. Enríquez, E. (2008). Caracterización Fisicoquímica y Antimicrobiana de la Miel de nueve Especies de Abejas sin aguijón (*Meliponini*) de Guatemala. *Interciencia* 33(12): 916-922.
- Díaz, A. (2009). Influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la calidad físico-química y biológica de la miel. Tesis. Doctorado en Ciencia de los Alimentos. Facultad de Zootecnia y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Zaragoza; 271 p.
- Díaz, A. Quicazán, M. Zuluaga, C. (2009). Clasificación de miel de abejas por origen utilizando la nariz electrónica en Colombia. *Alimentos Hoy, Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* – ACTA 18.

- DGNTI. (2002). Dirección general de normas y tecnología industrial. Resolución 229. Azúcar, melazas y miel de abejas. 16 p.
- Enríquez, M; Yurrita, C; Dardón, M. (2006). Biología y Reproducción de Abejas Nativas sin aguijón, Universidad de San Carlos de Guatemala-USAC, Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología – *LENAP*: 18-40.
- Escriche, I. Visquert, M. Juan-Borrás, M. Fito, P. (2009). Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chem.* 112(2): 329–338.
- Fallico, B. Zappalà, M. Arena, E. Verzera, A. (2004). Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chem.* 85(2): 305–313.
- Fallico, B. Arena, E. Zappala, M. (2009). Prediction of honey shelf life. *Journal of Food Quality* 32: 352–368.
- Filtramex. (2012). Deshumidificación. [En línea]. Disponible en internet: <http://www.filtramex.com/index.html>
- Fattori, S. (2004). La miel: propiedades, composición y análisis físico-químico. *Apimondia*.
- Feversani, S. (2011). Meliponas: Abejas nativas. [En línea]. Disponible en internet: <http://www.info-bee.com.ar/files/docs/meliponas.pdf>. Acceso: Junio de 2013.
- Ferrufino, U., Vit P. (2013) Pot-Honey of Six Meliponines from Amboró National Park, Bolivia. pp. 409-416. In: Vit, P., S.R.M. Pedro & D.W. Roubik (eds.), Pot-Honey: A legacy of stingless bees. Springer Science+Business Media; New York, USA. xxviii + 654 p
- Freitas, W., Aroucha, E., Soares, K., Mendes, F., Oliveira, V., Lucas C., dos Santos, M. (2010). Parâmetros físico-químicos do mel de abelha sem ferrão (*Melipona subnitida*) após tratamento termico. *Acta Veterinaria Brasilica* 4 (3), 153-157.
- Fuenmayor, C. Zuluaga-Domínguez, C. Díaz-Moreno, A. Quicazán, M. (2012). “Miel de angelita”: Nutritional composition and physicochemical properties of *Tetragonisca angustula* honey. *Interciencia* 37:142–147.
- García, C. Cury, K. Dussán, S. (2010). Evaluación poscosecha y estimación de vida útil de guayaba fresca utilizando el modelo de Weibull. *Acta Agron.* 59(3): 347–355.
- Gentry, T. Roberts, J. (2004). Formation kinetics and application of 5-hydroxymethylfurfural as a time-temperature indicator of lethality for continuous pasteurization of apple cider. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5: 327–333.
- GMS, (1999). Grupo Mercosur. Resolución 56. Identidad y calidad de miel. 8 p.
- Gobierno Federal de México. (2010). Manual de buenas prácticas pecuarias en la producción de miel. 2da Edición. 10 p.

- Gonçalves, S. (2006). Qualidade do mel de abelhas (*Apis mellifera* L.) em função do ambiente e do tempo de armazenamento. Universidad Federal de Piau. 64 p.
- Gonzales, A. Burin, L. Buera, M. (1999). Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color. *Food Res. Int.* 32, 185–191.
- González-Acereto, J. Quezada-Euán, J. Medina-Medina, L. (2006). New perspectives for stingless beekeeping in the Yucatan: results of an integral program to rescue and promote the activity. *J Apic Res* 45(3):234-239.
- González-Paramás, A. Gómez-Bárez, J. Marcos, C. García-Villanova, R. Sánchez-Sánchez, J. (2006). HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of hive (honey and bee-pollen). *Food Chem.* 95: 148–156.
- Gould, G. (2006). History of science – spores. Lewis B Perry Memorial Lecture 2005. *Journal of Applied Microbiology* 101:507–513.
- Halcroft, M; Spooner-Hart, R; Haigh, A; Heard, T; Dollin, A. (2013). The Australian stingless bee industry: a follow-up survey, one decade on. *J Apic Res.* 52(2):1-7.
- Hernández, C. Ascencio, D. Quicazán, M. (2014a). Valoración de Características Fisicoquímicas de Miel de Abejas Nativas Colombianas respecto a la Normatividad Vigente. Memorias del ENID. [En línea]. Disponible en internet: http://www.enid.unal.edu.co/2014/documentos/memorias_enid_2014/
- Hernández, C. Ascencio, D. Quicazán, M. (2014b). Indicadores microbiológicos de estabilidad e inocuidad de miel de *melliponaeburne* durante el almacenamiento. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 67(2): 828 – 830.
- Hernández, C. Quicazán, M. Ascencio, D. Zuluaga, C. (2014). Efectos de tratamientos térmicos sobre la calidad de miel de *Tetragonisca angustula*. Memorias del Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos – Cibia 9. 471.
- Herrera, M. Hernández, R. (1992). Intoxicacion alimentaria por *Clostridium perfringens* IV Congreso Nacional de Microbiología, Parasitología y Patología Clínica; San José, Costa Rica: Biblioteca Nacional de Salud y Seguridad Social - Caja Costarricense de Seguro Social: 61-63.
- Herrero, A. Romero, M. (2006). Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Rev Med Univ Navarra* 50(4):71–74.
- Hough, G. Garitta, L. Gómez, L. (2005). Sensory shelf-life predictions by survival analysis accelerated storage models. *Food Qual. Prefer.* 17:468–473.
- IBCE, (2010). Perfil de mercado de abejas nativas. http://ibce.org.bo/images/estudios_mercado/perfil_mercado_miel_abejas_CB16.pdf. 27 p.
- ICONTEC. (2000). Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Norma Técnica Colombiana. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de *Clostridium* sulfito reductores e identificación de

- Clostridium perfringes*. Técnicas de recuento de colonias. NTC 4834. Bogotá D.C., Instituto Icontec, 15 p.
- ICONTEC. (2002). Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Norma Técnica Colombiana. Productos lácteos. Leche pasteurizada. NTC 506. Bogotá D.C., Instituto ICONTEC. 14 p.
- ICONTEC. (2005a). Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Norma Técnica Colombiana. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Preparación de muestras para ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para análisis microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y de diluciones decimales. NTC 4491-1. Bogotá D.C., Instituto Icontec, 7 p.
- ICONTEC. (2005b). Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Norma Técnica Colombiana. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Preparación de muestras para ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para análisis microbiológico. Parte 4: Reglas específicas para la preparación de productos diferentes de leche, productos lácteos, carne, productos cárnicos, pescado y productos de la pesca. NTC 4491-4. Bogotá D.C., Instituto Icontec, 14 p.
- ICONTEC. (2007). Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Norma Técnica Colombiana. Miel de abejas. NTC 1273. Bogotá D.C., Instituto ICONTEC. 21 p.
- ICONTEC. (2009a). Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Norma Técnica Colombiana. Microbiología de alimentos y productos de alimentación animal. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 2: Técnica de recuento de colonias en productos con actividad acuosa (Aw) inferior o igual a 0,95. NTC 5698-2. Bogotá D.C., Instituto Icontec, 12 p.
- ICONTEC. (2009b). Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Norma Técnica Colombiana. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30°C. NTC 4519. Bogotá D.C., Instituto Icontec, 12 p.
- eIEN, (1988). Instituto Ecuatoriano de Normalización. INEN 572. Miel de abejas - requisitos. 8 p.
- IHC, (2001). Minutes of the IHC meeting (Louvain-la-Neuve). (2001). International Honey Commission (IHC). <http://www.apis.admin.ch/host/honey/minutes.htm>.
- INBORCA, (2006). Instituto boliviano de Normalización y calidad. NB - 38023. Norma Boliviana para Miel de Abeja - Requisitos. 8 p.
- INN, (2007). Instituto de normalización. NCh 616. Miel de abejas - denominación y requisitos. 10 p.
- IMNC, (1997). Instituto Mexicano de normalización y certificación. NMX-F-036. Miel de abejas - especificaciones. 5 p.

- Iglesias, M. De Lorenzo, C. Polo, M. Martin, A. Álvarez, P. Pueyo, E. (2004). Usefulness of amino acids composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. *J. Agric. Food Chem.* 52:84–9.
- Iglesias, M. Martín-Alvarez, P. Polo, M. De Lorenzo, C. Gonzalez, M. Pueyo, E. (2006). Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature. *J. Agric. Food Chem.* 54(24):9099–9104.
- Iurlina, M. (2005). Characterization of microorganisms in Argentinian honeys from different sources. *Int J Food Microbiol* 105: 297–204.
- Jeyaprakash, A. Marjorie, A. Hoy, M. Allsopp, M. (2005). Bacterial Diversity in Worker Adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) Assessed Using 16S rRNA Sequences. *Journal of Invertebrate Pathology.* 84:96-103.
- Jones, R. (2013). Stingless Bees: A Historical Perspective. pp. 219-227. En: Vit, P., S.R.M. Pedro & D.W. Roubik (eds.), *Pot-Honey: A legacy of stingless bees*. Springer Science+Business Media; New York, USA. xxviii + 654 p.
- Josiane, M. Machado, E. Alencar, V. Marchini, L. Faquinello, P. Satsuki, E. (2011). Microbial flora in organic honey samples of Africanized honeybees from Parana River islands. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 462–467.
- Juszczak, L. Socha, R. Ro, J. Fortuna, T. Nalepka, K. (2009). Physicochemical properties and quality parameters of herb honeys. *Food Chemistry* 113: 538–542.
- Kacániová, M. Chlebo, R. Kopernicky, M. Trakovická, C. (2004). Microflora of the honeybee gastrointestinal tract. *Folia Microbiology.* 49(2):169-171.
- Kerr, W. (1997). A importância da meliponicultura para o país. *Rev. Biotecnol. Ciência Desenvol.* 1: 42–44.
- Kowalsk, S. Lukaszewicz, M. Bednarz, S. Panús, M. (2012). Diastase Number Changes During Thermal and Microwave Processing of Honey. *Czech J. Food Sci.* 30(1): 21–26.
- Labuza T.P. (2000). Determination of shelf-life of foods. Department of Food Science and Nutrition, University of Minnesota. St. Paul. 32 pp.
- Laverde, J. Egea, L. Rodríguez, D. Peña, J. (2010). Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de las abejas y la apicultura en Colombia con énfasis en miel de abejas. *Proy. Transic. la Agric. Minist. Agric. y Desarro. Rural - Univ. Nac. Colomb.* 224 p.
- Lewis, M. (2006). Thermal Processing. En: Brenna, J. (ed). *Food Processing Handbook*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Lichtenberg-kraag, B., 2012. Saccharose degradation over time in stored honey : influence of time , temperature , enzyme activity and botanical origin. , 51(4), pp.217–224.

- Lusby, P. Coombes, A. Wilkinson, J. (2005). Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Arch Med Res* 36: 464–467
- MAG-MEIC, (2009). Ministerio de agricultura y ganadería y Ministerio de energía, industria y comercio. RTCR 423. reglamento tecnico para miel de abejas. 14 p.
- Man, D. (2002). La caducidad de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza – España. 107p.
- Michener, C. (2007). The bees of the world. The Johns Hopkins University Press. Baltimore and London..913 p.
- Michener, C. (1979). Bioeography oh the bees. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 66: 277–347.
- Ministerio de la Protección Social. (2010). Resolución 1057 de 2010. Calidad de la miel. 9 p.
- Morales, I. Calderón, S. (2009). Evaluación de la vida útil de productos innovadores. *Rev. Aliment.* 20(6): 1–10.
- Moreira, R. De Maria, C. Pietroluongo, M. Trugo, L. (2007). Chemical changes in the non-volatile fraction of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food Chem:* 1236–1241.
- Nates-Parra, G. (2001). Las Abejas sin aguijón Del Genero Melipona (*Himenóptera: Meliponinae*) En Colombia. Dpto. Biología, Universidad Nacional, Bogotá - Colombia, 3(2), 21-33.
- Nates-Parra, G. (2005). Foro Abejas silvestres y polinización. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica). 75, 7-20p.
- Nates-Parra, G; Rosso, J. (2013). Diversidad de abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini) utilizadas en meliponicultura en Colombia. *Acta biol. Colomb.* 18(3):415-426.
- Nevas, M. Lindström, M. Hörman, A. Keto-timonen, R. Korkeala, H. (2006). Contamination routes of Clostridium botulinum in the honey production environment. *Environ Microbiol.* 8: 1085–1094.
- Nieto, A. Correa, Y. García, J. Díaz, C. (2014a). Contenido mineral de mieles originarias de cultivos cafeteros de la Sierra Nevada de Santa Marta. *Rev Fac Nal Agr Medellín* 67(2):807–809.
- Nieto, A., García, J., Díaz, C., Quicazán, M. (2014b). Caracterización fisicoquímica de mieles originarias de cultivos cafeteros de la Sierra Nevada de Santa Marta. *Rev Fac Nal Agr Medellín* 67(2):804–806.
- Nieto, A., Quicazán, M. (2014c). Correlación de la medida de color de mieles colombianas en escala Pfund y el espacio de color CIE L* a* b*.

- Olaya, Y. (2014a). Contribución al establecimiento de índices de calidad e inocuidad de mieles de abejas colombianas. Trabajo de Grado. Carrera de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Colombia. 129 p.
- Olaya, Y. Gutiérrez, C. Hernández, C.(2014). Comparación entre la calidad microbiológica de la miel de *Tetragonisca angustula* y de *Apis mellifera*. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 67(2): 754-756.
- Oliveira, R. Franco, C. Nunes. F. Sorraggi, A. Vasconcelos, S. Roubik, D. Goulart, L. (2004). Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on rapd markers. *Genet. Mol. Biol.* 27(2):181–186.
- Oliveira, R. De Ribeiro, R. Carneiro, S. Mársico, E. Cunha, F. Adam, C. (2012). Influence of the time - temperature binomial on the hydroxymethylfurfural content of floral honeys subjected to heat treatment. *Cienc. agrotec., Lavras* 36. (2): 204–209.
- Ortiz, A. Fernández, M. Muñoz, E. (1996). Principales características de la miel de la Alcarria. Servicio Investigación y Tecnología Agraria.
- Özbalci, B. Boyaci, İ. Topcu, A. Kadilar, C. Tamer, U. (2013). Rapid analysis of sugars in honey by processing Raman spectrum using chemometric methods and artificial neural networks. *Food Chem.* 136(3-4):1444–1452.
- Palazón, M. Pérez, D. Abellán, P. Ros, G. Romero, F. Vidal, M. (2009). Determination of shelf-life of homogenized apple-based beikost storage at different temperatures using Weibull hazard model. *Food Sci. Technol.* 42: 319–326.
- Pérez, R. Iglesias, M. Pueyo, E. Gonzalez, M. Lorenzo, C. (2007). Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. *J. Agric. food Chem.* 55. 1-5.
- Philippe, J. (1990). *Guía del apicultor*, 1ª ed. vol. 1. Madrid (España): Ediciones Mundi-Prensa.
- Piana, G. Ricciardelli-D'albore, G. Isola, A. (1989). La miel: Alimento de conservación natural. Origen, recopilación y comercialización. 1ª edición. Madrid – España. 110 p.
- Piergiovanni, L. Limbo, S. (2010). Foodpackaging: Materiali, tecnologie e qualità de gli alimenti. *Springer-Verlag Ital*: 421–438.
- Pimentel, D. Wilson, C. McCullum, C. Huan, R. Dwen, P. Flack, J. (1997). Economic and environmental benefits of biodiversity. *Biosci.* 47(11):747–757.
- Pucciarelli, A. Schapovaloff, M. Kummritz, S. Seňuk, I. Brumovsky, L. Dallagnol, A. (2014). Microbiological and physicochemical analysis of yateí (*Tetragonisca angustula*) honey for assessing quality standards and commercialization. *Rev. Argentina Micrología* 46(4):325–32.
- Quicazán, M. Zuluaga, C. Fuenmayor, C (2009). Perspectivas para la caracterización físicoquímica de productos apícolas de variedades de abejas nativas en Colombia. *Acta Biol. Col.* 14: 185-186.

- Rall, V. Bomboa, A. Lopesa, T. Carvalhob, L. Silva, M. (2003). Honey consumption in the state of Sao Paulo: a risk to human health? *Food Microbiol.* 299–303.
- Ramos-Elorduy, J. Costa-Neto, E y Landero-Torres, I. (2009). Comparación de especies de abejas comestibles en la Sierra de Jibóia, (Bahia, Brasil) y Sierra de Zongolica (Veracruz, México). *Revista Colombiana de Entomología* 35(2): 217-223.
- Rasmussen, C. Castillo, P. (2003). Estudio preliminar de la Meliponicultura o apicultura silvestre en el Perú (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Revista Peruana de Entomología* 43:159-164.
- Rodríguez, M. (2007). Evaluación del mercado la miel angelita en Bogotá. Informe final. Corporación Andina de Fomento – CAF. Bogotá, Colombia. 42 p. Disponible en: <http://www.caf.com/attach/9/>
- Roig-Alsina, A. Vossler, F. Gennari, G. (2013). Stingless Bees in Argentina. En: Vit P, Pedro SRM, Roubik DW, editores. Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees. Berlin. *Springer Verlag*: 125-134.
- Romero, R. (2007). Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª ed. México: Editorial Médica Panamericana. 1789 p.
- Romero, A. Fernández, I. (2007). Manual de cirugía menor en atención primaria. Editorial club universitario. San Vicente – España. 356 p.
- Rotarescu, R. Vidican, C. (2010). Impact's assessment of thermal processing and storage conditions on enzymatic activity and HMF content in honey. *Carpathian J. Food Sci. Technol.* 2 (1): 1–13.
- Rosso, J. Nates-Parra G. (2005). Meliponicultura: una actividad generadora de ingresos y servicios ambientales. *LEISA Revista de Agroecología* 21, 14–17.
- Rózańska, H. Osek, J. (2012). Effect of Storage on Microbiological Quality of Honey. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 56 (2): 161–163.
- Rybak - Chmielewska, H. (2007). Changes in the carbohydrate composition of honey undergoing during storage. *Journal of Apicultural Science*. 51(1). 39-49.
- Sahinler, N. (2007). Effects of heating and storage on hydroxy methylfurfural and diastase activity of different Turkish honeys. *Journal of Apicultural Research*, 46(1): 34-39.
- Sáinz, C. Gomez, C. (2000). Mielles Españolas. Madrid (España): Ediciones Mindi-Prensa.
- Saka, N. Sak-Bosnar, M. (2012). A rapid method for the determination of honey diastase activity. *Talanta* 93:135–8.
- Salinas-Hernández, R. González-Aguilar, G. Pirovani, M. Ulín-Montejo, F. (2007). Modelación del deterioro de productos vegetales frescos cortados. *Univ. y Ciencia. Trópico Húmedo* 23(2):183–196.

- Salvachúa, J. Marchamalo, C. Robles, E. (2005). Recolección, obtención y procesado artesanal de la miel. *Alimentación, equipos y Tecnología*: 93-100.
- Samborska, K., Czelejewska, M. (2012). The Influence of Thermal Treatment and Spray Drying on the Physicochemical Properties of Polish Honeys. *Journal of Food Processing and Preservation*. 1–13.
- Sanz, M. Del Castillo, M. Corzo, N. Olano, A. (2001). Formation of Amadori compounds in dehydrated fruits. *Food Chem.* 49: 5228–5231.
- Sanz, M Del Castillo, M. Corzo, N. Olano, A. (2003). 2-Furoylmethyl amino acids and hydroxymethylfurfural as indicators of honey quality. *J. Agric. Food Chem.* 51(15):4278–83.
- Silva, W. Paz, P. (2012). Abelhassemferrão: muitomais do que umaimportância económica. *Natureza on line* 10 (3):146–152.
- Snowdon, J. Cliverb, D. (1996). Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology* 31: 1-26.
- Souza, B. Roubik, W. Ortrud, B. Heard, T. Enríquez, E. Carvalho, C. Villas-Bôas, G. Marchini, L. Locatelli, J. Persano-Oddo, L. Almeida-Muradian, L. Bogdanov, S. Vit, P. (2006). Composition of stingless bee honey: setting quality standards. *Interciencia* 31: 867-875
- Souza, B.(2009). Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae): Trigonini) do Estado da Bahia. *Ciência e tecnologia de Alimentos Campinas* 29 (4): 798–802.
- Subramanian, R. Hebbar, H. Rastogi, N. (2007).Processing of honey: A review. *Int. J. Food Prop* 10: 127–143.
- Thiel, T. (1999). Sterilization of broth media by tyndalization. Contributed by University of Missouri –St. Louis. Science in the real word: *Microbes in action*.
- Toriz, C. Roman, A. (2005). La Producción Apícola en México. Universidad Autónoma de México. Disponible en: <http://132.248.62.51/sv/sv/2005/mayo/his200505a1.html>.
- Tortora, G. Funke, B. Case, C. (2007). Introducción a la microbiología. 9a ed. Buenos Aires, Médica Panamericana. 988 p.
- Tosi, E. Ré, E. Lucero, H. Bulacio, L. (2004).Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. *LWT - Food Sci. Technol.*37(6):669–678.
- Tsigouri, A. Passaloglou, M. (2000).A scientific note on the charactreristics of thymes honey from the Greek islan of Kthira. *Apidologie* 31: 457–458.

- Turhan, I., Tetik, N., Karhan, M., Gurel, F., Tavukcuoglu, R. (2008). Quality of honeys influenced by thermal treatment. *LWT - Food Science and Technology*, 41(8):1396–1399.
- Ulloa, J. Mondragón, P. Rodríguez, R. Reséndiz, J. Rosas, P. (2010). La miel de abeja y su importancia. *Revista Fuente* 1(4): 11-18.
- USDA, (2011). United States Department of Agriculture. [En línea]. Disponible en internet: <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>
- USDA. (2015). National Nutrient Database for Standard Reference [En línea]. Disponible en internet: <http://www.nifa.usda.gov/>
- Uthurry, C. Gómez, C. (2007). Los compuestos polifenólicos en productos apícolas y su función antioxidante. *Rev. Apic.* 145: 9–15.
- Venturieri, G; Alves, D; Villas-Bôas, J; Carvalho, C; Menezes, C; Vollet-Neto, A; y col. (2012). Meliponicultura no Brasil: Situação Atual e Perspectivas Futuras para o Uso na Polinização Agrícola. En: Imperatriz-Fonseca VL, Canhos DAL, Alves DA, Saraiva AM, Editores. Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. p. 213-236.
- Vica, M. Glevitzky, M. Dumitrel, G. Popa, M. Varvara, S. (2009). Microbiological Role in Hazards Analysis of Natural Honey Processing. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. 15(3):353-360.
- Vit, P. Bogdanov, S. Kilchenmann, V. (1994) Composition of Venezuelan honeys from stingless bees (Apidae: Meliponinae) and *Apis mellifera* L. *Apidologie* 25: 278-288.
- Vit, P. Fernandez-Maeso, M. Ortiz-Valbuena, A. (1998). Potential use of the three frequently occurring sugars in honey to predict stingless bee entomological origin. *J. Appl. Ent.* 122: 5-8.
- Vit, P. (1999). Uso de Meliponinos en Apiterapia y Vigilancia Ambiental. pp. 39-44. En: Memorias del Primer Seminario Nacional Sobre Abejas sin Aguijón. Boca del Río Veracruz, México.
- Vit, P. Medina, M. Enríquez, E. (2004) Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee World* 85: 2-5.
- Vit, P. (2005) *Denominaciones de Origen de la Miel de Abejas en Venezuela*. APIBA-CDCHT Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. 57 pp.
- Vit, P. Almeida-Muradian, L.B. Hitomi Matsuda, A. Enríquez, E. Barth, O. (2005). Iniciando una base de datos para proponer estándares de calidad de mieles de abejas sin aguijón. pp. 1-7- In: IV Seminario y taller mesoamericano sobre abejas sin Aguijón. San Ignacio, Chalatenango, El Salvador.
- Vit, P; Enríquez, E; Barth, M; Matsuda, A. (2006a). Necesidad del Control de Calidad de la Miel de Abejas sin aguijón. *MedULA, Rev. Fac. Med. Univ. Los Andes* 15: 89-95.

- Vit, P. Hernández, J. Mercado, R. (2006b). Revisión sobre el conocimiento de las mieles uniflorales venezolanas. *MedULA, Rev. Fac. Med. Univ. Los Andes* 15(1): 29–39.
- Vit, P. (2009a). Caracterización fisicoquímica de mieles de abejas sin aguijón (Meliponini) de Venezuela. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*. 40(2): 1-7
- Vit, P. Gutiérrez, M. Rodríguez-Malaver, A. Aguilera, G. Fernández-Díaz, C. Tricio, A. (2009b). Comparison of honeys produced by the bee yateí (*Tetragonisca fiebrigi*) in Argentina and Paraguay. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 43(2): 219-26.
- Vit, P. Pedro, S. Roubk, D. (2013). Pot-honey: A legacy of stingless bees. Springer Editorial. 697 p.
- White, J. Siciliano, J. (1980). Hydroxymethylfurfural and honey adulteration. *Journal association Official Analyt Chemistry* 63: 7-10.
- Zhang, Y. Song, Y. Zhou, T. Liao, X. Hu, X. Li, Q. (2012). Kinetics of 5-hydroxymethylfurfural formation in chinese acacia honey during heat treatment. *Food Sci. Biotechnol.* 21(6):1627–1632.